

Zur Strahlenresistenz von Saccharomyces - Stämmen

Einfluß von Genom und Umwelt auf die Röntgenstrahlenresistenz
diploider Stämme

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

1967

vorgelegt von

Horst - Ulrich Schädel

aus Berlin

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Zur Strahlenresistenz von Saccharomyces - Stämmen

**Einfluß von Genom und Umwelt auf die Röntgenstrahlenresistenz
diploider Stämme**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Horst - Ulrich Schädel

aus Berlin

1. Referent: Professor Dr. W. LASKOWSKI

2. Referent: Professor Dr. H. LÜERS

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 1967

Tag der Promotion:

15. DEZ. 1967



Meiner Mutter
in dankbarer Erinnerung

I N H A L T

	Seite
1. EINLEITUNG	3
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1. VERWENDETE SACCHAROMYCES-STÄMME	10
2.2. VERWENDETE KULTURMEDIENTEN	15
2.2.1. Vollmedium	15
2.2.2. Hefeextraktmedium	15
2.2.3. Synthetisches Medium	17
2.2.4. Synthetisches Medium + 18 Aminosäuren	18
2.3. VERWENDETE STRAHLENQUELLE	20
2.3.1. Absorbierte Dosis in der Bestrahlungsflüssigkeit	20
2.3.2. Absorbierte Dosis an der Oberflächengrenzschicht der Bestrahlungsflüssigkeit	21
2.4. EXPERIMENTELLE METHODEN	22
2.4.1. Vorkulturen	22
2.4.1.1. Flüssige Vorkulturen	22
2.4.1.2. Feste Vorkulturen	23
2.4.2. Waschen der Zellen	24
2.4.3. Bestimmung des Zelltiters, der koloniebildungsfähigen Zellen und Verdünnung der Suspensionen	25
2.4.4. Bestimmung der Teilungsgeschwindigkeit der Zellen	26
2.4.4.1. Direkte Methode durch mikroskopische Zellzählungen	26
2.4.4.2. Indirekte Methode durch Bestimmung der Zellkonzentration im Medium mit Hilfe von Extinktionsmessungen	27
2.4.5. Bestrahlungsvorgang	27
2.4.6. Postirradiative Verfahren	29

2.5.	ZUM BEGRIFF DER ÜBERLEBENDEN UND DER INAKTIVIERUNG	30
2.6.	ZUR DARSTELLUNG DES KURVENVERLAUFS IN DEN ABBILDUNGEN	30
3.	ERGEBNISSE	31
3.1.	UMWELTEINFLÜSSE RELATIV LANGE ZEIT VOR DER BESTRAHLUNG	31
3.1.1.	Variationen der Vorkultur	31
3.1.1.1.	Variation der Kohlenstoffquelle im Vorkulturmedium	32
3.1.1.2.	Variation des Hefeextraktes im Vorkulturmedium	43
3.1.1.3.	Variationen der Mediumkomponenten in synthetischen Vorkulturmedien	48
3.2.	UMWELTEINFLÜSSE RELATIV KURZE ZEIT VOR DER BESTRAHLUNG	51
3.2.1.	Versuche mit der Strahlenschutzsubstanz L-Cystein	51
3.2.2.	Versuche zum Sauerstoffeffekt bei Bestrahlungen	52
3.3.	UMWELTEINFLÜSSE NACH DER BESTRAHLUNG	54
3.3.1.	Variation der Zusammensetzung des Nachkulturmediums	55
3.3.1.1.	Überlebendenzahl auf SM-Agar + 18 Aminosäuren	56
3.3.1.2.	Überlebendenzahl auf SM-Agar ohne Isoleucin und Valin, dem 1 mol/Liter KCl zugesetzt ist	59
3.3.1.3.	Überlebendenzahl auf SM-Agar	61
3.3.2.	Untersuchung der Recovery-Aktivität	64
4.	DISKUSSION	70
5.	ZUSAMMENFASSUNG	87
6.	LITERATUR	88
7.	ABBILDUNGEN	94

1.

E I N L E I T U N G

Bei der Hefe Saccharomyces ist der Aufbau einer Serie von Stämmen unterschiedlichen Ploidiegrades möglich, die verschiedentlich zur Untersuchung strahlenbiologischer Fragen herangezogen wurden (vergleiche beispielsweise LUCKE u. SARACHEK, 1953; MORTIMER, 1958; 1961; LASKOWSKI, 1960; 1962a; BARSUKOW, MALINOWSKI u. MITJUSCHOWA, 1963). Zur quantitativen Analyse bestimmter Strahleneffekte ist von LASKOWSKI (1962a; 1962c) ein System weitestgehend isogener und homozygoter Saccharomyces-Stämme verschiedenen Ploidiegrades aufgebaut worden, und es ist gezeigt worden, daß diese Stämme eine ploidiegradabhängige Röntgenstrahlenempfindlichkeit besitzen.

Innerhalb dieses Stammsystems sind die Zellen des haploiden Stammes deutlich empfindlicher gegenüber der strahleninduzierten Hemmung ihrer unbeschränkten Teilungsfähigkeit als die Zellen des diploiden Stammes. Es liegt also ein Resistenzanstieg von Haplonten zu Diplonten vor. Mit Zunahme des Ploidiegrades von Tri- zu Hexaplonten folgt wieder ein zunehmender Resistenzverlust.

In mehreren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Strahlenempfindlichkeit eines Saccharomyces-Stammes durch Änderung einzelner Gene beträchtlich abgewandelt werden kann. So ist beispielsweise eine erhöhte Strahlenresistenz zu beobachten, wenn bei Diplonten die Paarungstypallele nicht mehr homozygot, sondern heterozygot vorliegen (MORTIMER, 1958; LASKOWSKI, 1962b). Dieser Effekt wurde als α -Effekt bezeichnet (LASKOWSKI).

Bei haploiden Hefen kann eine bestimmte Gruppe genetischer Veränderungen einen Anstieg der Röntgenstrahlenresistenz sogar über die des zugehörigen Diplonten hinaus bewirken (MOUSTACCHI u. MARCOVICH, 1962).

Eine andere, ebenfalls genetisch bedingte Erhöhung der Strahlenresistenz bestimmter Saccharomyces-Stämme wurde von LASKOWSKI (1962a; 1962c) beschrieben. Dieser Resistenzgewinn tritt nicht bei haploiden, sondern bei di- und polyploiden (= höherploiden) Stämmen auf, die entweder für Serin oder für Isoleucin und Valin (= IV) bedürftig sind¹⁾. Er tritt weiterhin nicht nach UV-Bestrahlung auf, sondern nur nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen und addiert sich zu dem durch die Heterozygotie der Paarungstypallelen bedingten Resistenzeffekt. Bei Verlust der Aminosäurebedürftigkeit geht der Resistenzeffekt ebenfalls wieder verloren, wie für eine Rückmutante (oder Revertante) zur Prototrophie bei dem IV-bedürftigen Stamm gezeigt wurde (LASKOWSKI, 1962a).

Diese Ergebnisse lassen bestimmte Schlußfolgerungen und Annahmen zu:

1. Auf Grund eines einzelnen Mutationsschrittes, der an sich eine bestimmte Synthesefähigkeit des Organismus' betrifft und mit der Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen nicht unmittelbar in Zusammenhang steht, tritt eine Modifikation der Strahlenempfindlichkeit ein. Es ist anzunehmen, daß infolge der Mutation eine Änderung in der Zelle stattgefunden hat, die modifizierend auf die Letalwirkung der Strahlen wirkt.
2. Die Tatsache, daß die intrazelluläre Änderung sich aber nur strahlenschutzend in Zellen mit einem Ploidiegrad >1 auswirkt, weist auf mögliche Unterschiede im Inaktivierungsmechanismus zwischen haploiden und höherploiden Saccharomyces-Zellen hin. Es liegen mehrfache Hinweise dafür vor, daß bei Saccharomyces die Inaktivierung von Haplonten überwiegend auf der Induktion von rezessiven Letalmutationen beruht, während die Inaktivierung höherploider Zellen durch einen überwiegenden Anteil induzierter dominanter Letalmutationen verursacht wird (siehe beispielsweise OWEN u. MORTIMER, 1956; STEIN u. LASKOWSKI, 1960). Demzufolge erscheint die Vermutung nicht unberechtigt, daß die genetisch bedingte intrazelluläre Änderung besonders vor dominant wirkenden Letalschäden schützt.

¹⁾ Nicht jede Aminosäurebedürftigkeit führt zu einer Resistenzerrhöhung diploider Stämme, wie im Falle eines methioninbedürftigen Stammes gezeigt wurde (LASKOWSKI, 1962a).

Von dieser Sachlage ausgehend sollen im folgenden Untersuchungen beschrieben werden, die zur Sammlung weiterer Informationen über die Modifizierungsmöglichkeiten und damit auch über mögliche Manifestierungsprozesse dominant letaler Strahlenschäden unternommen wurden. Zu diesem Zweck sollen insbesondere Versuche dargestellt werden, die die Abhängigkeit des mit der IV-Bedürftigkeit verbundenen Resistenzeffekts von Strahlenresistenz modifizierenden Mitteln zeigen, um auf diesem Wege Aufschluß über einflußreiche Parameter zu gewinnen.

Schon seit geraumer Zeit wurde von verschiedenen Autoren über Möglichkeiten berichtet, die Zahl der eine Bestrahlung überlebenden Zellen bei Mikroorganismen durch Veränderung bestimmter Umweltbedingungen zu modifizieren. Eine übersichtliche Einteilung der verschiedenen, die Strahlenwirkung modifizierenden Umweltbedingungen soll hier unter dem Gesichtspunkt ihres relativen Wirkungsbeginns und ihrer Wirkungsdauer erfolgen. So lassen sich eindeutig Umweltbedingungen, die vor einer Bestrahlung auf die Zellen einwirken, von solchen trennen, die erst nach der Bestrahlung wirksam werden. Die vor einer Bestrahlung wirkenden Umweltbedingungen lassen sich wieder in zwei Gruppen unterteilen: Solche, die nur relativ kurzfristig vor der Bestrahlung wirksam werden und solche, die längere Zeit vor der Bestrahlung einen Einfluß auf die heranwachsende Zellpopulation haben. Auch die erst nach der Bestrahlung wirksam werdenden Umweltbedingungen lassen sich im Hinblick auf ihre Wirkungsdauer in zwei Gruppen aufteilen.

Gruppe A.

Der Zeitpunkt des Einsetzens bestimmter Umweltbedingungen liegt vor der Bestrahlung

Die in dieser Gruppe angeführten Umweltbedingungen bzw. ihre Auswirkungen sind natürlich auch während der Bestrahlung wirksam. Wenn sie während der Bestrahlung nicht mehr wirken und der alte Zustand wiederhergestellt ist, kann keine Veränderung der Strahlenreaktion der Mikroorganismen erwartet werden.

a. Der Umwelteinfluß beginnt relativ lange Zeit vor der Bestrahlung

Hierher gehören alle strahlenmodifizierende Einflüsse, die bereits in Vorkulturverfahren angewendet werden und Methoden, die langfristig vor der Bestrahlung einen besonderen Stoffwechselzustand in den Mikroorganismen erzeugen (Die Zeit der Beeinflussung vor der Bestrahlung ist hier lang im Verhältnis zur normalen Zellzyklusdauer).

Also beispielsweise:

1. Die Anzucht der Zellen bei verschiedenen Zuckerkonzentrationen im Vorkulturmedium (für Saccharomyces z. B. GREVE, 1961)
2. Die Anzucht bei Mangel an Stickstoffquellen im Vorkulturmedium (für Saccharomyces z. B. BEAM, MORTIMER, WOLFE u. TOBIAS, 1954)
3. Die Anzucht bei Angebot besonderer Kohlenstoffquellen im Vorkulturmedium (beispielsweise Natriumlactat; für Saccharomyces z. B. MOUSTACCHI, 1963)
4. Die Verwendung von Zellen aus verschiedenen Entwicklungsphasen, z. B. der logarithmischen oder stationären Wachstumsphase (für Saccharomyces z. B. SCHÄDEL, LOCHMANN u. LASKOWSKI, 1966)
5. Die Verwendung teilungs-synchronisierter Zellen in spezifischen Teilungsphasen (für Saccharomyces z. B. HILZ u. ECKSTEIN, 1964)

Daher sei betont, daß im Gegensatz zur Gruppe A, insbesondere zu A. b. die folgenden Umwelteinflüsse nicht als "dosis- oder strahlenmodifizierend" anzusehen sind, sondern auf Modifikationen der Reaktionen der Mikroorganismen auf eine Bestrahlung hinweisen.

- a. Der Umwelteinfluß nach dem Bestrahlungsende beginnend
wirkt über mehrere Tage

Also beispielsweise:

1. Die Aufbewahrung von bestrahlten Zellen im oder auf dem Wachstumsmedium für definierte Zeiten bei Wachstum behindernden oder verhindernden Temperaturen (beispielsweise die sogenannte Kälte-reaktivierung; für Saccharomyces z. B. LATARJET, 1943)
2. Die Aufbewahrung bestrahlter Zellen in destilliertem Wasser oder in Pufferlösungen bei Bebrütungstemperatur im Dunkeln, die abschließend in oder auf Wachstumsmedium gebracht werden (für Saccharomyces z. B. KOROGODIN, 1958; PATRICK, HAYNES u. URETZ, 1964; PATRICK u. HAYNES, 1964)
3. Die Bebrütung bestrahlter Zellen im Dunkeln, die auf Agar, dem eine Energiequelle (z. B. in Form von Glucose) zugesetzt wurde, liegen und abschließend mit Wachstumsmedium überschichtet werden (Zellfixier-Technik zur Recovery; für Saccharomyces vgl. 2.4.6., Seite 29 und 3.2.2., Seite 65).

- b. Der Umwelteinfluß nach dem Bestrahlungsende beginnend
wirkt über wenige Stunden

Also beispielsweise:

1. Die Aufbewahrung bestrahlter Zellen im Nährmedium bei optimalen Wachstumsbedingungen mit anschließender Weiterbestrahlung (Recovery subletaler Schäden; für Saccharomyces z. B. BACCHETTI u. MAURO, 1965; BACCHETTI et al., 1965)
2. Die Aufbewahrung bestrahlter Zellen in destilliertem Wasser oder in Pufferlösungen bei Bebrütungstemperatur mit anschließender Weiterbestrahlung (Recovery subletaler Schäden; für Saccharomyces z. B. BACCHETTI et al., 1966).

Die Umwelteinflüsse der Gruppe B scheinen weit wirksamer bei höherploidem als bei haploidem Saccharomyces-Zellen zu sein (vgl. PATRICK, HAYNES u. URETZ, 1964; PATRICK u. HAYNES, 1964; BACCHETTI et al. 1965). Nimmt man an, daß sie vornehmlich diejenigen induzierten Strahlenschäden teilweise wieder rückgängig machen können, die zur Inaktivierung höherploidier Zellen führen, so erscheinen sie als besonders wichtig bei Untersuchungen zur Analyse des mit der IV-Bedürftigkeit verbundenen Resistenzeffektes. Auch dieser Effekt wurde ja nur bei höherploidem Zellen, nicht aber bei haploidem beobachtet. Es erscheint daher nicht uninteressant, die Auswirkungen der Einflüsse des Erbguts, die verbunden mit der Aminosäurebedürftigkeit zu einem Resistenzgewinn führen, mit den Einflüssen der Umwelt, die nach der Bestrahlung einen gewissen Anteil inaktivierter diploider Zellen zu reaktivieren gestatten, zu vergleichen.

Jedoch auch die Möglichkeiten der Beeinflussung des Stoffwechsels der Zellen vor der Bestrahlung (Gruppe A) können wichtig für eine Analyse des Resistenzeffektes sein. So wiesen Untersuchungen von HAEFNER (1965) auf einen möglichen Einfluß des Vorkulturmediums auf die Röntgenstrahlenresistenz IV-bedürftiger Diplonten hin.

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung erhält man schließlich durch die Kombination von Umwelteinflüssen, die in der Gruppe A aufgeführt sind, mit denen aus Gruppe B. Aus dem Zusammenspiel beider Gruppen von Umwelteinflüssen können dann weitere Informationen über die Beeinflussbarkeit strahleninduzierter dominanter Letalmutationen gewonnen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. VERWENDETE SACCHAROMYCES-STÄMME

Die zu den Untersuchungen herangezogenen Stämme wurden von LASKOWSKI (1962a) aufgebaut. Ihre Eigenschaften, insbesondere Paarungstyp, Ploidiegrad und Ansprüche an das Nährmedium wurden identifiziert. Zum Zeitpunkt dieser Identifikation waren die Stämme weitestgehend homozygot und isogen. Die charakteristischen Eigenschaften wurden während der hier beschriebenen Untersuchungen laufend überwacht; dabei wurden keine Veränderungen festgestellt.

Für eine Abschätzung möglicher Veränderungen der hier verwendeten Saccharomyces-Stämme kann man eine mittlere Mutationsrate von 10^{-8} Mutationen pro Generation, Zelle und Gen zu Grunde legen (vgl. z. B. HAEFNER, 1965). Mit Beendigung der vorliegenden Untersuchungen waren die Dauerkulturen seit ihrer Identifikation etwa sechsmal übertragen worden, wobei sie jeweils etwa sechs Generationen durchliefen. Weiterhin erscheint es nicht ungerechtfertigt, die Zahl der mutablen Gene pro Chromosomensatz bei Saccharomyces mit etwa 10^5 anzunehmen. Danach wäre die Wahrscheinlichkeit W, daß in den jetzt vorliegenden haploiden Dauerkulturen eine Zelle durch eine aufgetretene Mutation verändert ist:

$$\begin{aligned} W &= 10^{-8} \cdot 6 \cdot 10^5 \cdot 6 \\ &= 3,6 \cdot 10^{-2} . \end{aligned}$$

Diese Abschätzung, die für den Fall eines höherploiden Organismus' unter der Berücksichtigung dominanter und rezessiver Veränderungen komplizierter wird, nimmt einen sehr vereinfachten Fall an. Sie geht z. B. auch von der stillschweigenden Annahme aus, daß bei einer Überimpfung eine repräsentative Stichprobe entnommen wird. In Wirklichkeit wird bei einer Überimpfung aber stets nur eine punktförmige Probe entnommen.

Da man annehmen muß, daß die auftretenden Mutationen keineswegs homogen verteilt, sondern in Form von einzelnen wenigen Klonen mutierter Zellen vorliegen, kann bei einem Zusammentreffen passender Umstände sehr wohl in der neu angelegten Dauerkultur ein größerer Teil sprunghaft veränderter Zellen vorliegen.

Wird ein solcher Mißstand beobachtet, ist seine Behebung einfach. Man kann zum ersten, sofern noch möglich, die Überimpfung wiederholen, wobei man von einer anderen Stelle des mütterlichen Dauerkulturrasens abimpft. Zum anderen kann man mit Hilfe der Stempeltechnik (LEDERBERG u. LEDERBERG, 1952) einige Einzellklone isolieren, bei denen die bekannten Eigenschaften erkannt werden können.

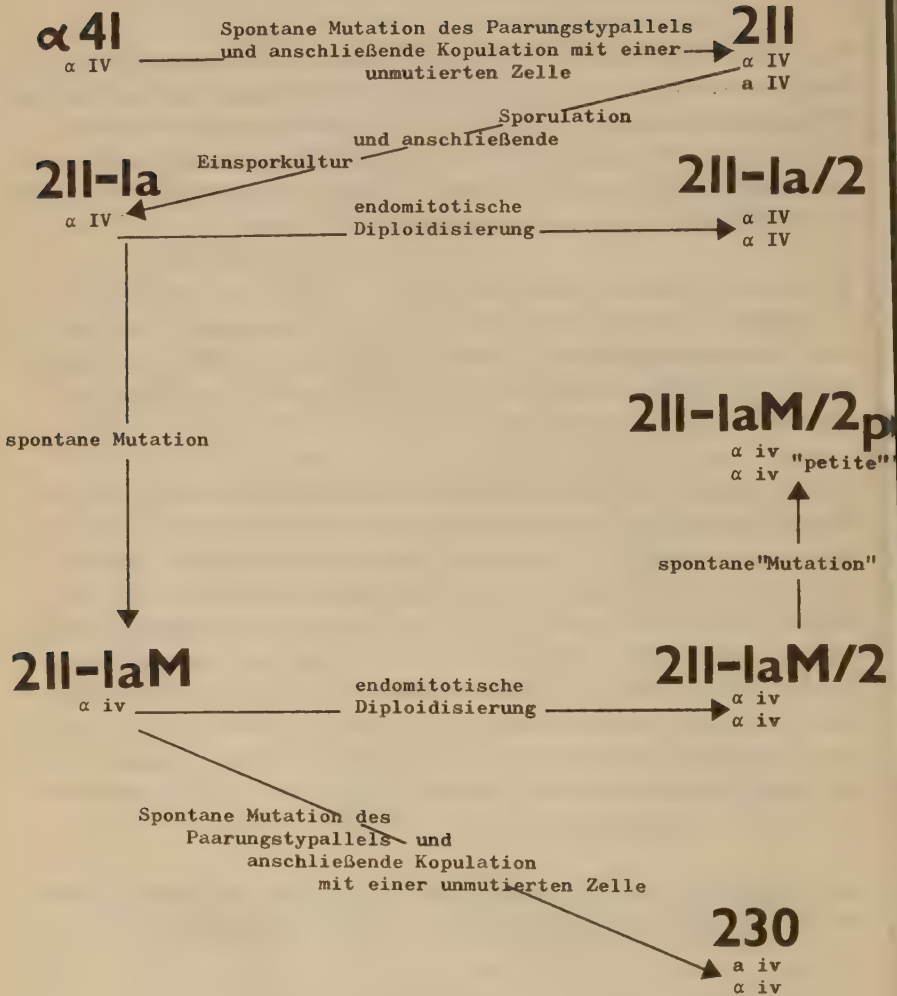
Es ist jedoch gerechtfertigt anzunehmen, daß bis zum Abschluß der Untersuchungen unter den dann schließlich nach der ausgeführten Schätzung vorhandenen ungefähr 4 % mutierten Zellen keine Zelle vorhanden war, die eine neue Eigenschaft mit Selektionswert hinsichtlich der überwachten Eigenschaften aufwies.

Damit ist aber nicht die Möglichkeit ausgeschlossen, daß während der Untersuchungszeit Mutationen aufgetreten sind, welche die nicht überwachten Eigenschaften veränderten. Es wurden jedoch keine systematischen Verschiebungen der Daten aus experimentellen Ergebnissen beobachtet. Darüber hinaus waren alle neu festgestellten Eigenschaften konstant und alle neu festgestellten Reaktionen der Saccharomyces-Stämme reproduzierbar. Da zudem die Dauerkulturen auf einem reichhaltigen Vollmedium (VM; siehe Seite 15) gezüchtet wurden, ist es berechtigt anzunehmen, daß sie unter keinem Selektionsdruck standen und keine Populationsumschichtungen stattgefunden haben, die in irgendeiner Weise die Untersuchungsergebnisse beeinflussen konnten.

Über den genetischen Zusammenhang der zu den Untersuchungen verwendeten Stämme gibt die auf Seite 12 folgende Skizze Auskunft.

Bezeichnung des
haploiden Stammes
sowie bestimmter
Allele

Bezeichnung des
diploiden Stammes
sowie bestimmter
Allele



a, α : Paarungstypallele
IV, iv : Isoleucin, Valin.

Kleine Buchstaben bedeuten Bedürftigkeit für den Stoff. Für sämt-
liche anderen Allelen sind die obigen Stämme homozygot und isogen. Vgl.
LASKOWSKI, 1960, 1962a.

Der diploide Ausgangsstamm 211 des auf Seite 12 abgebildeten Stammsystems leitete sich von einer diploiden Einzelzelle aus dem haploiden Urstamm ab. Diese diploide Einzelzelle war durch Kopulation einer haploiden Zelle mit einer anderen haploiden Zelle entstanden, die durch eine Spontanmutation am Paarungstyplocus zum entgegengesetzten Paarungstyp mutiert war.

Der haploide Urstamm des gesamten Stammsystems, der Stamm α -41, war durch verschiedene Laboratoriums-Kreuzungen, unter anderem auch durch Kreuzungen von Saccharomyces carlsbergensis mit Saccharomyces cerevisiae entstanden. Da aus diesem Grunde eine zufriedenstellende Artsystematisierung für die zu den Untersuchungen herangezogenen Stämme nicht möglich ist, soll in dieser Arbeit die Bezeichnung lediglich mit dem Gattungsnamen erfolgen.

Der mit einer Aminosäurebedürftigkeit verbundene Resistenzeffekt wurde bei verschiedenen Arten ionisierender Strahlen und bei zwei verschiedenen Aminosäurebedürftigkeiten beobachtet. Die folgenden Untersuchungen wurden aber auf den Resistenzgewinn gegenüber Röntgenstrahlen bei IV-bedürftigen Stämmen beschränkt. Es wurden darüber hinaus nur die haploiden und diploiden Stämme berücksichtigt. Das bedeutet, daß im wesentlichen die Strahlenreaktion der Zellen von vier verschiedenen Saccharomyces-Stämmen untersucht wurde.

Das sind:

Stamm	Stamm
211-1a (prototroph, haploid)	211-1a/2 (prototroph, diploid)
211-1aM (auxotroph, haploid)	211-1aM/2 (auxotroph, diploid)

Der Stamm 211-1a ist der Ausgangsstamm der drei anderen aufgeführten Stämme (vgl. Seite 12). Aus diesem Stamm wurde eine spontan aufgetretene IV-auxotrophe Mutante, der Stamm 211-1aM, isoliert. Für die Doppelbedürftigkeit zeigte sich bei Kreuzungsexperimenten und Ascusanalysen nur ein mutiertes Gen verantwortlich. Nach HAWTHORNE u. FRIIS (1964) ist bei dem Stamm 211-1aM der locus is_2 mutiert.

Aus der Mutante 211-1aM entstand auf dem Wege über eine endomitotische Diploidisierung der Stamm 211-1aM/2. Dieser Stamm unterscheidet sich also von dem - ebenfalls nach einer Selbstdiploidisierung isolierten - prototrophen Diplonten 211-1a/2 nur in einem Allelenpaar.

Der Stamm 230 leitet sich von einer diploiden Zelle ab, die in der Kultur des Haplonten 211-1aM auftrat ¹⁾ und mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert wurde. Der Stamm erwies sich als IV-bedürftig und sporulationsfähig.

Der Stamm 211-1aM/2p₁ wurde als atmungsdefekte Spontanmutante des entsprechenden Stammes identifiziert. Er wurde 1966 aus einer unbestrahlten Kultur isoliert, die auf VM-Agar (siehe Seite 15) aufgewachsen war. Er unterschied sich von dem Ausgangsstamm durch seine kleinere, glatte Kolonieform. Bei einem Tetrazolium-Überlagerungstest nach OGUR, JOHN u. NAGAI (1957) färbten diese Kolonien das Überlagerungsmedium nicht an im Gegensatz zu atmungsaktiven Kolonien. Der Stamm wuchs nicht auf einem VM-Agar, der anstelle von Glucose als einzige Kohlenstoffquelle 2 % Natriumlactat (vergleiche SHERMAN, 1963) oder 3 % Glycerin (vergleiche beispielsweise LYMAN, 1965, Seite 4) enthielt.

Um welchen speziellen Atmungsdefekt es sich dabei handelte, und ob es sich um eine plasmatische oder genetische "petite"-Mutation handelte, wurde nicht näher untersucht.

Alle zu den Untersuchungen herangezogenen Stämme wurden als Dauerkulturen auf VM-Agar gehalten. Sie wurden mindestens einmal pro Jahr in verschraubbare Röhrchen auf frisch bereiteten VM-Agar übertragen, nach der Übertragung je nach der Wachstumsgeschwindigkeit 24 bis 48 Stunden bei 30°C bebrütet und dann bei etwa +5°C in den verschlossenen Dauerkulturröhrchen aufbewahrt. Für Experimente wurde jeweils einem dieser Röhrchen mit einer Impföse eine Probe entnommen und in das für das jeweilige Experiment vorgesehene Vorkulturmedium übertragen. Je nach der Häufigkeit der Entnahme aus den Röhrchen reichte das Zellmaterial einer Dauerkultur 5 bis 12 Monate. Auch wenn das Zellmaterial nach etwa 10 bis 12 Monaten noch nicht zur Neige ging, wurde die Dauerkultur in einem anderen Dauerkulturröhrchen frisch angelegt.

¹⁾ Mögliche Ursachen für die Entstehung von Diplonten in haploiden Kulturen werden bei LASKOWSKI (1960) diskutiert.

2.2. VERWENDETE KULTURMEDIENTEN

Für die Experimente wurde eine Vielzahl von Medien benutzt, von denen die wichtigsten und häufigsten in ihrer Standardzusammensetzung im folgenden beschrieben werden. Die Medien mit besonderer Zusammensetzung und Medien, die nur einmalig benutzt wurden, werden an den entsprechenden Stellen beschrieben. Insbesondere sind diejenigen Medien, die im Rahmen der Untersuchung der Mediumabhängigkeit der Strahleneffekte aufgebaut wurden, an Ort und Stelle beschrieben.

2.2.1. Vollmedium (VM)

Mengen in 1 Liter vollentsalztem Wasser*

Yeast-Extract (Difco)	10,0 g
Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut (Merck)	5,0 g
Glucose, 99,5 %ig (Deutsche Maizena-Werke)	20,0 g

Zur Verfestigung wurden bei Bedarf 20,0 g Bacto-Agar (Difco) zugesetzt. Die Sterilisation geschah 15 min. bei 123°C.

2.2.2. Hefeextraktmedium (YG)

Mengen in 1 Liter vollentsalztem Wasser*

Yeast-Extract (Difco)	10,0 g
Glucose, 99,5 %ig (Deutsche Maizena-Werke)	2,5 g

Zur Verfestigung wurden bei Bedarf 20,0 g Bacto-Agar (Difco) zugesetzt. Die Sterilisation geschah 15 min. bei 123°C.

* Das vollentsalzte Wasser wurde mit einem automatischen APURA-Kationen- und Anionen-Mischbettauustauscher auf Polystyrolharzbasis hergestellt. Das Endvorfilter auf Kieselgurbasis entfernte alle Schwebstoffe der Größe $> 3\mu$. Das frisch bereitete vollentsalzte Wasser hatte pH = 7, Restsalzgehalt unter 1,0 mg/Liter und einen Gehalt an SiO_2 unter 0,2 mg/Liter. Die Reinheit des Wassers wurde von einem automatischen Leitfähigkeitsmesser überwacht, der auf 2 μS als oberer Leitfähigkeitsgrenze eingestellt war.

In den Kulturmedien spielt der Hefeextrakt sicherlich eine wichtige Rolle (Näheres über den Hefeextrakt der Firma Difco siehe DIFCO-Manual, Difco Inc., Detroit/Mich., USA, 1953). Er enthält alle für das Wachstum der Hefen wichtigen Bestandteile in für diesen Organismus sicherlich optimalen Verhältnissen.

Darüber hinaus enthält der Hefeextrakt aber auch Komponenten, die für viele Hefen sicherlich nicht essentiell sind. So enthält er offensichtlich Isoleucin und Valin, und es ist beispielsweise nicht nötig, für das Wachstum der IV-bedürftigen Stämme in dem Medium durch zusätzliche Gaben dieser Aminosäuren zu sorgen.

Will man nun alle überflüssigen Mediumkomponenten ausschalten, muß man ein Medium aus den einzelnen Bestandteilen zusammensetzen. Ein solches Medium soll im folgenden Synthetisches Medium (SM) genannt werden ¹⁾. Sein Rezept folgt auf Seite 17. Das SM wurde in Anlehnung an die Angaben für "Difco Yeast Nitrogen Base" (DIFCO-Manual) hergestellt und besaß gegenüber den Hefeextrakt-Medien (mit $\text{pH} = 6,5 \pm 0,2$) den $\text{pH} = 3,5 \pm 0,2$.

Ein synthetisches Medium, dem eine Reihe von Aminosäuren zugesetzt wurden, die für Wachstum und Vermehrung der untersuchten Saccharomyces-Stämme nicht unbedingt notwendig sind, soll im folgenden Synthetisches Medium + 18 Aminosäuren (SM + 18 AS) genannt werden. Sein Rezept folgt auf Seite 18.

¹⁾ Dem SM waren zusätzlich einige Substanzen zugesetzt, die von den zu den Untersuchungen herangezogenen Saccharomyces-Stämmen zu Wachstum und Vermehrung nicht unbedingt benötigt wurden.

2.2.3. Synthetisches Medium (SM)

Mengen in 1 Liter vollentsalztem Wasser

Vitamine

(+)-Biotin, Vitamin H (Schuchardt)	2 γ
Thiamin·HCl, Vitamin B ₁ , Aneurin (Merck)	400 γ
Pyridoxin·HCl, Vitamin B ₆ , Adermin (Merck)	400 γ
Ca-D(+)-Panthotenat (Merck)	400 γ

Aminosäuren

L(+)-αAlanin (Merck)	200,0 mg
L(+)-Cysteinhydrochlorid (Schuchardt)	200 mg
L(+)-Histidin-dihydrochlorid (Merck)	10,0 mg
DL-Isoleucin, reinst, Gemisch der 4 Stereoisomeren (Schuchardt)	100 mg
DL-Methionin (Merck)	10,0 mg
DL-Tryptophan (Merck)	10,0 mg
DL-Valin, über 99,5 %ig (Schuchardt)	100 mg

Adenin, für biochemische Zwecke (Merck)	10,0 mg
Uracil (Merck)	10,0 mg

Spurenelemente

H ₃ BO ₃	10 γ
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10 γ
KJ	10 γ
FeCl ₃ ·6H ₂ O	5 γ
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7 γ

Mineralsalze

KH ₂ PO ₄	875 mg
K ₂ HPO ₄	125 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500 mg
NaCl	100 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	100 mg

Stickstoffquelle

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
---	-------

Kohlenstoffquelle

Glucose, 99,5 %ig (Deutsche Maizena-Werke)	20,0 g
--	--------

Zur Verfestigung wurden bei Bedarf 20,0 g Bacto-Agar (Difco) zugesetzt.
Die Sterilisation geschah 10 min. bei 115°C.

(Die in dem Rezept angegebenen Gewichte sind bis zur letzten aufgeführten Ziffer genau)

2.2.4. Synthetisches Medium + 18 Aminosäuren (SM + 18 AS)

Mengen in 1 Liter vollentsalztem Wasser

Vitamine

gleiche Mengen wie bei SM

Aminosäuren

L(+) α Alanin (Merck)	100	mg
L(+) Argininmonochlorid (Merck)	50	mg
L(-) Asparagin (Merck)	50	mg
L(+) Cysteinchlorid (Schuchardt)	200	mg
L(-) Cystin (Merck)	50	mg
L-Glutaminsäure, rein (Merck)	50	mg
Glycocoll, nach Sörensen (Merck)	50	mg
L(+) Histidindihydrochlorid (Merck)	10,0	mg
DL-Isoleucin, reinst, Gemisch der 4 Stereoisomeren (Schuchardt)	100	mg
L-Leucin (Schuchardt)	50	mg
L(+) Lysinmonochlorid (Merck)	50	mg
DL-Methionin (Merck)	10,0	mg
DL-Phenylalanin (Merck)	100	mg
L(-) Prolin (Merck)	50	mg
DL-Serin, p.a. (Serva)	100	mg
DL-Threonin (Merck)	100	mg
DL-Tryptophan (Merck)	10,0	mg
L-Tyrosin, reinst (Schuchardt)	50	mg
DL-Valin, über 99,5 %ig (Schuchardt)	100	mg

Adenin, für biochemische Zwecke (Merck)	10,0	mg
Uracil (Merck)	10,0	mg

Spurenelemente

Mineralsalze

Stickstoffquelle

Kohlenstoffquelle

gleiche Substanzen und Mengen wie bei SM

Zur Verfestigung wurden bei Bedarf 20,0 g Bacto-Agar (Difco) zugesetzt.
Die Sterilisation geschah 10 min. bei 112°C.

Die mit Agar verfestigten Medien wurden jeweils direkt vor dem Verbrauch zubereitet und sterilisiert. In besonderen Fällen, beispielsweise vor sehr umfangreichen Experimenten, wurden die Medien 48 Stunden vor Verbrauch zubereitet und sterilisiert und direkt vor dem Experiment lediglich auf eventuelle Infektionen durchgemustert. Ein Einfluß des Alters verfestigter Medien innerhalb dieser kurzen Zeit auf das Wachstum oder die Strahlenempfindlichkeit der verwendeten Stämme wurde nicht beobachtet. Erst Medien, die älter als etwa 10 Tage waren, begannen Austrocknungserscheinungen zu zeigen, denen durch besondere Maßnahmen, z. B. durch Verwendung eines Luftbefeuchters mit Hygrostaten, entgegengewirkt werden mußte.

Die flüssigen Medien wurden jeweils mindestens einmal pro Monat hergestellt. Innerhalb dieser Zeit nicht verbrauchte Medien wurden verworfen. Ein Einfluß des Alters des Mediums innerhalb dieser Zeit auf das Wachstum oder die Strahlenempfindlichkeit der verwendeten Stämme wurde nicht beobachtet.

Die flüssigen Medien wurden in watterverstopften Reagenzgläsern sterilisiert und nach dem Sterilisieren bei etwa $+ 4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Vor dem Einbringen von Impfgut wurden sie annähernd auf die Temperatur des Inokulats - in besonderen Fällen, also beispielsweise auf $+ 30^{\circ}\text{C}$ - temperiert, um eine Wachstumsverzögerung durch Temperaturschocks infolge unterschiedlicher Mediumtemperaturen zu verhindern. Bei einer Beimpfung mit einem Okulat, das direkt vom Schrägagar kam, spielte jedoch die Temperierung der Wachstumsmedien wegen der sowieso recht langen Lag-Phasenzeit keine Rolle.

2.3. VERWENDETE STRAHLENQUELLE

Für die Experimente wurde eine Machlett OEG-60 Röntgenröhre mit Wo-Anode und 1 mm-Berylliumfenster verwendet. Die Röhre wurde bei einer Spannung von 50 kV und einem Heizstrom von 27 mA betrieben.

2.3.1. Absorbierte Dosis in der Bestrahlungsflüssigkeit

Bei einem Objektabstand von 15,4 cm betrug die Dosisleistung bei der gewählten Einstellung $12 \text{ krad} \cdot \text{min}^{-1} \pm 10 \%$. Sie wurde nach WEISS, ALLEN u. SCHWARZ (1955) mit einem Fricke-Dosimeter gemessen (G-Wert der Fricke-Lösung: 28,5. Messung der Extinktion bei 305nm). Die Schichtdicke der Fricke-Lösung betrug etwa 2,5 mm (zur Berechnung der Schichtdicke vgl. 2.4.5. Seite 27) und ähnelte damit der in allen Experimenten hergestellten dünnen Bestrahlungsschicht aus Hefesuspension.

Diese Angaben zur Dosisleistung stimmen mit denen von LYMAN (1965) ungefähr überein, der bei 50 kV, 25 mA und 15,4 cm Abstand für die gleiche Röhre 15 krad mitteilt, jedoch die Schichtdicke der Bestrahlungssuspension nicht erwähnt.

Von größerer Wichtigkeit als die absolute Dosimetrie der verwendeten Röhre und von ausschließlicher Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist aber die relative Vergleichsmöglichkeit der einzelnen Experimente untereinander. Diese ist vollauf gegeben, weil während der gesamten Untersuchungszeit die Einstellung der Röhre nicht geändert wurde. Die hier beschriebenen Experimente wurden im Laufe von etwa 3 Jahren veranstaltet.

Physikalische Parameter, welche von Einfluß auf die Strahlenreaktion der Saccharomyces-Zellen sein könnten und bei der Veränderung der Röhreneinstellung verändert werden könnten, brauchen daher nicht berücksichtigt zu werden. (Lediglich die Temperatur in dem Bestrahlungsraum wurde nicht konstant gehalten und schwankte zwischen 18° und etwa $25^{\circ}\text{C}.$)

Da es sich bei der verwendeten Röhre um eine Weichstrahlröhre handelte, deren Strahlung bei 60 kV Röhrenspannung nach SEIDEL (1961) ihr Maximum des Dosisleistungsspektrums bei 10 keV hat, liegt innerhalb der Suspensionsschicht ein Dosisleistungsgefälle vor, das aber bei der veranstalteten Messung nicht erfaßt wurde. Um eine möglichst homogene Verteilung der Hefezellen in der Bestrahlungssuspension zu erreichen, wurde die Flüssigkeit während der Bestrahlung gerührt. Die zu diesem Zweck verwendeten sterilen Magnetührstäbchen hatten immer dieselbe Größe und beeinflussten die Schichtdicken daher gleichstark.

Aus Kontrollgründen wurde auch bei den Messungen der Dosisleistung mit einem Fricke-Dosimeter die Dosimeterflüssigkeit gerührt. Zu diesem Zweck befand sich ein Magnetührstäbchen in der Bestrahlungsflüssigkeit.

2.3.2. Absorbierte Dosis an der Oberflächengrenzschicht der Bestrahlungsflüssigkeit

Nach den Angaben der Betriebsanleitung der Machlett OEG-Röhre beträgt die Dosisleistung der Strahlung, die auf die Oberfläche des Targets fällt, bei 50 kV, 1 mA und 10 cm Abstand $2,3 \text{ kr} \cdot \text{min}^{-1}$. Da bei der Errechnung der Dosisleistung in $\text{kr} \cdot \text{min}^{-1}$ für andere Stromstärken mit großer Annäherung das lineare Stromgesetz angewendet werden kann, ergibt sich für die gewählte Einstellung von 50 kV, 27 mA und 15,4 cm unter Zugrundelegung des quadratischen Abstandsgesetzes eine Dosisleistung von ca. $28 \text{ kr} \cdot \text{min}^{-1}$ oder ca. $26 \text{ krad} \cdot \text{min}^{-1}$ an der Oberflächen-grenzschicht, wenn man annimmt, daß $1 \text{ kr} = 0,94 \text{ krad}$ entsprechen.

2.4. EXPERIMENTELLE METHODEN

2.4.1. Vorkulturen

Zur Vorbereitung eines Röntgenbestrahlungsexperimentes wurde eine Probe der zu untersuchenden Saccharomyces-Stämme vom Schrägagar genommen und in die jeweilige Vorkultur überführt. Zur Vermeidung von experimentellen Behinderungen durch Ausfälle in Folge von Infektionen wurden Parallelkulturen angesetzt. Vor ihrer Weiterverwendung wurden die Kulturen auf Kontaminationsfreiheit makroskopisch und mikroskopisch untersucht. In der Regel wurde eine der Vorkulturen weiterverwendet; die Parallelkulturen wurden verworfen. Lediglich in besonderen Fällen, wie beispielsweise bei besonders geringer Vermehrung der Vorkulturzellen in nährstoffarmen Medien, wurden auch die Parallelkulturen weiterverarbeitet.

In der Regel erreichten die untersuchten Stämme in einer flüssigen Kultur unter den gewählten Bedingungen spätestens nach etwa 24 Stunden das Ende der logarithmischen Wachstumsphase (Ausnahmen siehe beispielsweise 3.3.1.1., Seite 56). Um eine möglichst weitgehend physiologisch einheitliche Population mit einem geringen Anteil knospender Zellen zu erzielen, wurden die Zellen im allgemeinen 72 Stunden, in seltenen Fällen mindestens 48 Stunden vorkultiviert.

Es wurden zwei Vorkulturverfahren angewendet:

2.4.1.1. Flüssige Vorkulturen

Die Zellen wurden aus der Dauerkultur des Schrägagarröhrchens in das Vorkulturmedium mit einer Impföse überführt. Das Medium wurde dann unter Schrägstellung des Reagenzglases (Winkel zur Senkrechten: 70°) zur Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche bei $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ maschinell geschüttelt. Die Schüttelfrequenz betrug 220 min^{-1} bei einer Amplitude von 2 cm.

Zu einigen Experimenten wurden größere Zellmengen benötigt, die in 300 ml Erlenmeyerkolben angezüchtet wurden. Hier betrug die Schüttelfrequenz 100 min^{-1} bei einer Amplitude von 15 cm.

Das Schütteln geschah bei einer Luftfeuchtigkeit des Schüttelerraums von $> 50 \%$ rel. Feuchte und bei Dunkelheit.

Das Beimpfen des Mediums, im allgemeinen 5 ml, für Wachstumsbeobachtungen 6 ml, wurde so vorgenommen, daß mindestens 2 bis $5 \cdot 10^6$ Zellen, - eine kleine Impföse (KOLLE-Halter) mäßig gefüllt -, inokuliert wurden. Bei größeren Flüssigkeitsmengen in Erlenmeyerkolben wurde für eine den Größenverhältnissen entsprechend größere Zellzahl gesorgt, um zu gewährleisten, daß der Mediumabbau durch die Zellen mit den Verhältnissen im Reagenzglas vergleichbar ist und die Kulturen etwa gleichlange logarithmische Wachstumszeiten besaßen.

Alle Gefäße waren während des Schüttelns mit Watte- oder Schaumstoffstopfen locker verschlossen.

Für besondere Fälle wurde eine flüssige Vor-Vorkultur angelegt. Sie wurde z. B. benötigt, um eine größere Zellzahl für eine Erlenmeyerkolben-Vorkultur zu gewinnen, oder für Vorkulturen in Reagenzgläsern, bei denen auf genau gleich hohen Anfangszelltitert Wert gelegt wurde (siehe beispielsweise 2.4.4.2., Seite 27).

2.4.1.2. Feste Vorkulturen

Die Zellen wurden aus der Dauerkultur des Schrägagarröhrchens mit einer Impföse entnommen und auf das in einer Petrischale ausgegossene, mit Agar verfestigte Vorkulturmedium gestrichen. Zur besseren Verteilung des Zellmaterials wurde das Inokulat mit einigen Tropfen steriler $m/20 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (im folgenden "Puffer" genannt) benetzt und die entstandene Suspension anschließend mit einem Glasspatel nach DRYGALSKI auf der Mediumoberfläche verteilt.

Nach 7 Tagen wurde der auf diesem Vorkulturmedium entstandene Heferasen wiederum mit einigen Tropfen Puffer benetzt und die so entstandene breiige Zellsuspension mit einem Glasspatel umgewalzt. Nach 14 Tagen wurden dann von diesem Medium die Hefezellen mit Puffer abgespült und in sterilen Zentrifugengläsern gesammelt. Während dieser relativ langen Vorkulturzeit lagen die Petrischalen bei $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln bei einer Luftfeuchtigkeit von $>70\%$ relativer Feuchte.

Die Infektionsquote dieser Vorkultur war relativ groß und lag nach 14 Tagen je nach Jahreszeit bei 10 bis 30 %, so daß mehrere Parallelkulturen angesetzt wurden. Es wurde jedoch schließlich nur eine Petrischale abgeerntet, wobei etwa 10^8 bis 10^9 Zellen gewonnen wurden, die je nach verwendetem Medium 0,1 bis 1,0 % Knospen enthielten.

Diese Vorkultur konnte als besonders günstig für die Schaffung einer Population mit physiologisch einheitlichen Zellen angesehen werden, die sich schon lange in der stationären Wachstumsphase befanden. Der physiologische Zustand der gewonnenen Zellen war besonders genau reproduzierbar, wofür man beispielsweise den von Vorkultur zu Vorkultur gleichen Anteil an knospenden Zellen und die besonders konstante Strahlenempfindlichkeit werten kann.

2.4.2.

Waschen der Zellen

Die aus den Vorkulturen stammenden Zellen wurden durch Absentrifugieren für 3 min bei etwa 650·g und darauf folgendes Resuspendieren in Puffer gewaschen. Dieser Arbeitsgang wurde zweimal wiederholt. Der dritte Waschvorgang wurde mit fraktioniertem Zentrifugieren für 1 - 3 min bei etwa 250·g beendet, womit eine Anreicherung der Einzelzellen im Überstand erreicht wurde. Für die Experimente wurden schließlich nur Suspensionen verwandt, deren Anteil an knospenden Zellen oder kleinen Zellgruppen bei höchstens 10 %, in den meisten Fällen jedoch sogar unter 4 % lag.

2.4.3. Bestimmung des Zelltiters, der koloniebildungsfähigen Zellen und Verdünnung der Suspensionen

Die Bestimmung des Zelltiters wurde mit Hilfe einer mikroskopischen Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK (Hämatocytometer) vorgenommen. Je nach der zugrunde liegenden Vorkultur und dem eventuell dazwischengeschalteten Anreicherungsverfahren wurde der Ausgangstiter der in dem Puffer suspendierten Zellen mit $2 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^7$ ml⁻¹ bestimmt.

Die Zahl der wirklich zu Kolonien aufwachsenden Zellen lag, insbesondere für den auxotrophen Stamm, bei den Kontrollen auf VM-Agar bei etwa 60 bis 70 % der gezählten Einheiten (Einzelzellen + Doppel- und Mehrfachzellen), wobei die Art des Vorkulturmediums von geringem Einfluß war.

Obwohl in einigen umfangreichen Zählungen der Zelltiter genau bestimmt wurde, konnte auch dann die Diskrepanz zwischen mikroskopisch gezähltem "Gesamtzelltiter" und schließlich anhand von koloniebildungsfähigen Zellen festgestelltem "Lebendzelltiter" nicht behoben werden.

Ein Teil dieser Diskrepanz kann sicher auf einen Anteil von nicht koloniebildungsfähigen Zellen zurückgeführt werden wie er beispielsweise von LASKOWSKI u. STEIN (1958) sowie POHLIT u. DOMKE (1966a) beobachtet wurde (Auftreten sog. avitaler Zellen).

Wie weiterhin leicht zu beobachten war, besaßen die Saccharomyces-Zellen eine gewisse Haftfähigkeit an Glas. Ein weiterer Teil der Diskrepanz zwischen mikroskopisch festgestelltem Zelltiter und der Zahl der zu Kolonien aufwachsenden Kontrollzellen kann daher auf Zellverluste infolge des vielfältigen Manipulierens mit Glasgeräten im Zuge der Herstellung der Verdünnungsreihen zurückgeführt werden.

Für die Bestimmung der Kontrollwerte bei Experimenten wurde aber immer von der Zahl der zu Kolonien aufgewachsenen unbehandelten Zellen ausgegangen; die durch die mikroskopische Zählung festgestellte Zellzahl wurde dann nicht mehr berücksichtigt. Die Zählkammerzählungen hatten daher für alle hier dargestellten Untersuchungen nur den Zweck des Erreichens einer ersten Näherung an den Zelltiter. Kontrollkriterium bei

Inaktivierungsexperimenten war immer die Zahl der in den unbehandelten Kontrollen aufgewachsenen Zellklone.

Bei vergleichenden Tests der koloniebildungsfähigen Zellen auf den verschiedenen Medien gab es in den Kontrollen bei den verwendeten Medien hinsichtlich der Zahl der aufwachsenden Zellklone keine Unterschiede, die größer als 10 % waren ¹⁾. Trotzdem wurde zur Berechnung der Überlebenden nach Inaktivierungsexperimenten stets von den aufgewachsenen Kontrollklonen auf demselben Medium ausgegangen.

Die Verdünnung der Zellsuspensionen wurde mit steriler $m/20 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung vorgenommen. Die Verdünnungsschritte innerhalb einer Verdünnungsreihe, die für ein Experiment erforderlich war, wurden mit höchstens 1:10-Schritten vorgenommen. Größere Verdünnungsschritte wurden allenfalls zum Erreichen eines nicht zu hohen Ausgangstiters angewendet.

2.4.4. Bestimmung der Teilungsgeschwindigkeit der Zellen

Die Bestimmung der Zellzyklusdauer erfolgte durch zwei Methoden. Die eine Methode bestand aus einer direkten Beobachtung der sich teilenden Zellen; die andere, hauptsächlich angewendete, benutzte die zunehmende Trübung des flüssigen Wachstumsmediums, die mit Hilfe der Extinktion gemessen wurde, als Maß der Zellvermehrung.

2.4.4.1. Direkte Bestimmung durch mikroskopische Zellzählungen

Die Suspension unbestrahlter Zellen wurde auf eine dünne Schicht VM-Agar gebracht, der auf einem großen Mikroskopier-Deckglas lag. Dieses Deckglas wurde dann mit dem VM-Agar nach unten hängend (gewissermaßen als Deckel) auf eine feuchte Kammer gelegt. Durch die

¹⁾ Ausnahme: Die Zahl der koloniebildungsfähigen Zellen des IV-auxotrophen Stammes 211-1aM/2 betrug auf SM-Agar + 1m KCl - Ileu - Val (vgl. Seite 60) nur etwa 50 % von der Zahl der auf VM-Agar zu Kolonien aufgewachsenen Zellen.

VM-Agarschicht hindurch wurde zu bestimmten Zeiten an verschiedenen markierten Einzellklonen die mikroskopisch beobachtbare Zellzahl bestimmt. Während der Beobachtungszeit stand das Mikroskop in einem Brutraum bei einer Raumtemperatur von $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Mit Hilfe dieser Methode konnten nur bis zu fünf Teilungsschritte verfolgt werden. Die Zahl der insgesamt bei allen Einzellklonen gezählten Zellen wurde als Gesamttiter betrachtet. Dieser Gesamttiter ist also durch eine absolute Zellzahl bestimmt.

2.4.4.2. Indirekte Bestimmung durch Bestimmung der Zellkonzentration im Medium mit Hilfe von Extinktionsmessungen

Die Zellen der jeweiligen Saccharomyces-Stämme wurden, wie unter 2.4.1.1. (Seite 22) beschrieben, im flüssigen Medium inokuliert. Während der Wachstumszeit wurden die das Medium enthaltenden Reagenzgläser oder Erlenmeyerkolben mit seitlich angeschmolzenem Reagenzglas bei 30°C geschüttelt. Das Wachstum wurde dann durch Messung der Trübung des Mediums bestimmt. Diese wurde mit Hilfe der Extinktion in einem LANGE-Colorimeter mit Grünfilter (500 bis 570 nm) gemessen. Innerhalb des größten Teils des jeweils dargestellten Kurvenbereichs ist die Zellzahl annähernd proportional der Extinktion. Wie Kalibrierungsexperimente zeigten, steigt bei den Diplonten erst von einer Extinktion $E > 0,6$ ab die Zellzahl schneller als die Extinktion (vergleiche hierzu auch POHLIT u. DOMKE, 1966a).

2.4.5. Bestrahlungsvorgang

Die im Puffer suspendierten Zellen wurden in Bestrahlungsschälchen gebracht, die entweder einen Durchmesser von $30,9 \pm 1,5$ mm oder $65,5 \pm 0,4$ mm hatten und entweder mit 2,0 ml oder 8,8 ml Suspension beschickt wurden, was eine Schichtdicke von 2,4 - 2,9 mm bzw. 2,5 - 2,6 mm ergab.

In den Strahlenschutzversuchen wurden die Zellsuspensionen bestimmte Zeiten vor der Bestrahlung mit der in Puffer gelösten Schutzsubstanz versetzt. In den Experimenten zur Untersuchung des Sauerstoffeffektes wurde die Suspension vom gelösten O_2 befreit, indem in einer Gaskammer die in einer Bestrahlungsschale ruhende Suspension vor der Bestrahlung mit chemisch reinstem, getrocknetem und durch sterile Watte gefilterten Stickstoff (Stickstoff, nachgereinigt, der Fa. LINDE, Berlin) durchblasen wurde. Zur Aufrechterhaltung der Stickstoffatmosphäre wurde während der Bestrahlung der Stickstofffluß nicht unterbrochen.

Bei allen Bestrahlungsversuchen wurde während der Bestrahlung für gute Durchmischung der Zellsuspensionen durch Rühren mit einem magnetischen Rührsystem gesorgt. Zur Kompensation der unterschiedlichen Schichtverdickungen bei den unterschiedlichen Suspensionsmengen in den zwei verschiedenen Bestrahlungsschälchen wurden in die großen Bestrahlungsschälchen jeweils zwei Magnetrührstäbchen eingebracht. Vergleichende Kontrollinaktivierungsversuche ergaben, daß bei den möglicherweise immer noch gering unterschiedlichen Schichtdicken keine systematischen Abweichungen der Überlebendenprozente auftreten, die außerhalb der experimentellen Streuung lagen.

Von dem ersten Abzentrifugieren des Vorkulturmediums bis zum Einbringen der Zellsuspensionen in den Strahlengang der Röntgenröhre lagen die Zellen durchschnittlich 1 Stunde, bei umfangreichen Experimenten maximal 2 Stunden im Puffer. Insgesamt verweilten die Zellen - bei Hinzurechnung der Bestrahlungszeiten - 1,2 bis (umfangreiche Experimente) 6 Stunden im Puffer. Die nach Beendigung der Bestrahlungen vorgenommenen Endkontrollen ergaben für diesen Zeitraum keine Abweichungen der koloniebildungsfähigen Zellen von den Anfangskontrollen, die über 10 % hinausgingen. Für diese relativ kurzen Zeiten konnte damit ausgeschlossen werden, daß während der Puffer-Verweilzeit bei den untersuchten Saccharomyces-Stämmen der Anteil der koloniebildungsfähigen Zellen sank. Trotzdem wurden die Überlebenden immer in Verhältnis gesetzt zu dem Mittelwert aus der jeweiligen Anfangs- und Endkontrolle.

2.4.6.

Postirradiative Verfahren

Im allgemeinen wurden Proben der Zellsuspensionen unmittelbar, - das heißt 0,5 bis 15 min nach der Bestrahlung -, auf verfestigte Medien aufgetropft und mit sterilen Glasspateln auf der Mediumoberfläche verteilt. Die Proben wurden so bemessen, daß ein Titer von 50 bis 500 Überlebenden pro Petrischale zu erwarten war. Als Optimum wurde ein Titer von 400 Überlebenden angestrebt, bis zu dem nach HAEFNER (1961) das Aufwachsen aller koloniebildungsfähigen Zellen ohne gegenseitige Behinderung in einer Petrischale der gewählten Größe gewährleistet ist. Im allgemeinen wurden mindestens 4 Petrischalen desselben Mediums parallel beimpft und der Mittelwert aus allen gezählten Überlebenden den Berechnungen zugrunde gelegt.

Bei einem Teil der Experimente wurden Proben der Suspensionen auf Glucose-Agar ¹⁾ getropft, mit sterilen Glasspateln verteilt und bei 30°C für unterschiedlich lange Zeiten im Dunkeln bei einer relativen Luftfeuchte von > 50 % aufbewahrt. Nach Verstreichen der Zeiten wurden die auf diese Art und Weise auf der Agaroberfläche fixierten Saccharomyces-Zellen mit einem Nährmedium überschichtet und solange im Dunkeln bebrütet, wie es die jeweiligen Aufwuchszeiten der Zellen auf dem gewählten Überschichtungsmedium verlangten.

Dieses Verfahren soll künftig "Zellfixier-Technik" genannt werden.

Alle Saccharomyces-Zellen wurden bei $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ bebrütet. Die Dauer der Bebrütung richtete sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen auf dem entsprechenden Medium. In gesonderten Versuchen wurde das Erreichen der maximalen Überlebendenzahl geprüft und die Bebrütungszeit danach bestimmt. Sie lag zwischen 4 und 16 Tagen.

Abbildung 1a und 1b zeigen als Beispiel die Ergebnisse von Zählungen zum Erreichen der maximalen Überlebendenzahl auf mehreren Medien. Die einzelnen Kurvenpunkte beziehen sich stets auf die unbestrahlten Kontrollen desselben Alters.

¹⁾ Mengen in 1 Liter vollentsalztem Wasser:

Bacto-Agar (Difco)	20 g
Glucose, 99,5 %ig (Deutsche Maizena-Werke)	20 g
Die Sterilisation geschah 15 min bei 123°C.	

2.5. ZUM BEGRIFF DER ÜBERLEBENDEN UND DER INAKTIVIERUNG

Für Saccharomyces ist wiederholt beschrieben worden, daß in Zellen, die sich infolge einer Röntgenbestrahlung nicht mehr unbegrenzt oft teilen können (Verlust der Koloniebildungsfähigkeit), dennoch Stoffwechselprozesse ablaufen (Zusammenfassung beispielsweise bei HEMPEL, 1964). Als überlebende Zelle soll hier die zur Koloniebildung fähige Zelle bezeichnet werden.

Dementsprechend soll eine Zelle als röntgeninaktiviert gelten, wenn sie nicht mehr in der Lage ist, eine makroskopische Kolonie zu bilden.

2.6. ZUR DARSTELLUNG DES KURVENVERLAUFS IN DEN ABBILDUNGEN

Die Inaktivierungs- und Wachstumskurven verbinden die experimentell ermittelten Punkte. Der Kurvenverlauf wurde mit bloßem Auge angepaßt und von einer Berechnung des Kurvenverlaufs wurde abgesehen. Auch auf die Berechnung der Streubereiche wurde verzichtet. Das erscheint gerechtfertigt, weil aus dem Kurvenverlauf keine quantitativen Schlüsse gezogen werden sollen. Auch die Kurven in anderen Abbildungen stellen die möglichst beste Verbindung von Punkten dar und sind der Folge von Punkten ohne Berechnung mit bloßem Auge angepaßt.

3.

ERGEBNISSE

Im Folgenden sollen die Ergebnisse in der gewählten Einteilung (siehe Seiten 6 bis 8) dargestellt werden:

1. a. Der Umwelteinfluß beginnt relativ lange Zeit vor der Bestrahlung (siehe Seite 6).
b. Der Umwelteinfluß beginnt relativ kurze Zeit vor der Bestrahlung (siehe Seite 7).
2. Der Zeitpunkt des Einsetzens des Umwelteinflusses liegt nach der Bestrahlung (siehe Seiten 7 und 8).

3.1. UMWELTEINFLÜSSE RELATIV LANGE ZEIT VOR DER BESTRAHLUNG

3.1.1.

Variationen der Vorkultur

Werden die Zellen des IV-bedürftigen diploiden Saccharomyces-Stammes und Zellen des entsprechenden, nicht bedürftigen isogenen Diplonten mit Röntgenstrahlen inaktiviert, so ergeben sich für die beiden Stämme unterschiedliche, jedoch ganz typische, (und von der Vorkultur beeinflussbare) Inaktivierungskurven. Die Röntgeninaktivierungskurven der dazugehörigen haploiden Ausgangsstämme lassen im Vergleich hierzu keinen Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit untereinander erkennen.

Variiert man die Konzentration der Komponenten der Kulturmedien, so kann man sowohl für den IV-auxotrophen als auch für den prototrophen diploiden Stamm eine Veränderung der Strahlenempfindlichkeit erreichen, die in stammspezifischer Weise den Verlauf der Inaktivierungskurven verändert. Der zunächst beobachtete relative Resistenzeffekt kann auf mannigfaltige Weise variiert und auch annulliert werden.

Wie die im folgenden Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen, verändert sich der Verlauf der Inaktivierungskurven sowohl bei Veränderung der Konzentration der Glucose als auch des Hefeextrakts im Vorkulturmedium. Jedoch ist kein Einfluß eines dieser beiden Komponenten zu beobachten, wenn die entsprechende zweite Komponente durch eine andere Substanz (oder durch andere Substanzen) ersetzt wird. So läßt sich kein deutlicher Einfluß der Glucose beobachten, wenn der Hefeextrakt durch ein synthetisches Medium ersetzt wird, und es läßt sich kein deutlicher Einfluß des Hefeextrakts beobachten, wenn die Glucose durch äquivalente Mengen Natriumlactat ersetzt wird.

3.1.1.1. Variation der Kohlenstoffquelle im Vorkulturmedium

Verändert man in der Vorkultur bei konstantem Hefeextraktgehalt die Glucosekonzentration, so erwerben die Zellen des prototrophen Diplonten 211-1a/2 mit zunehmender Glucosekonzentration eine etwas größer werdende Überlebenswahrscheinlichkeit, während die Zellen des auxotrophen Diplonten 211-1aM/2 deutlich strahlenempfindlicher werden. Mißt man den Dosisreduktionswert ¹⁾ im Bereich des exponentiellen Teils der Inaktivierungskurven, also etwa bei den Punkten der neunzigprozentigen Inaktivierung, so findet man, daß mit zunehmender Glucosekonzentration die Dosisreduktion immer geringer wird. Schließlich sind beide Diplonten gleich röntgenempfindlich.

Verfolgt man die Veränderungen der Strahlenempfindlichkeit als Funktion der steigenden Glucosekonzentration im Vorkulturmedium bei konstanter Hefeextraktkonzentration noch weiter, so beobachtet man schließlich eine Umkehrung der Empfindlichkeitsverhältnisse bei den beiden Diplonten. Der ehemals röntgensensible prototrophe Diplont ist schließlich röntgenresistenter als der auxotrophe, nunmehr sensible Diplont.

¹⁾ Zur Definition des Dosisreduktionswerts siehe Seite 34.

Abbildung 2 zeigt den Verlauf der Inaktivierungskurven für die beiden Diplonten bei Vorhandensein des Resistenzeffektes und zum Vergleich die Kurven der beiden entsprechenden Haplonten. Die Kurven fassen die von LASKOWSKI (1962c) erzielten Ergebnisse zusammen. Das Vorkulturmedium bestand stets aus 1 % Hefeextrakt und 0,25 % Glucose.

Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Inaktivierungskurven der beiden Diplonten bei ungefähr maximaler Umkehrung der Empfindlichkeitsverhältnisse. Die Umkehrung der relativen Strahlenempfindlichkeiten, die im folgenden "negativer Resistenzeffekt" genannt werden soll, wird mit weiter steigender Glucosekonzentration wieder geringer und wird schließlich bei ziemlich hohen, für das Wachstum der untersuchten Stämme aber noch verträglichen Konzentrationen wieder aufgehoben. Beide Stämme sind bei etwa 8 % Glucose (= "hohen Konzentrationen") wieder etwa gleich röntgenempfindlich.

Das Verhalten der Röntgenempfindlichkeiten als Funktion der Glucosekonzentration des Vorkulturmediums ¹⁾ bei konstantem Hefeextraktgehalt ist bei drei ausgewählten Strahlendosen in Abbildung 4 dargestellt. Man kann dort leicht ablesen, daß bei einer relativ niedrigen Glucosekonzentration (0,5 %) und dann noch einmal bei einer relativ hohen Konzentration (8 %) die Strahlenempfindlichkeit des auxotrophen und des prototrophen Diplonten gleich sind.

Zwischen diesen Werten ist stets der negative Resistenzeffekt zu finden.

Noch deutlicher kann man die Veränderung der Strahlenempfindlichkeit der beiden Diplonten erkennen, wenn man die Resistenzverschiebung bei einer bestimmten Inaktivierungsrate betrachtet. Aus diesem Grunde ist in Abbildung 5 bei einer neunzigprozentigen Inaktivierung (10 % Überlebende) die Veränderung der LD_{10} ²⁾ als Funktion der Glucosekonzentration dargestellt.

1) Glucosekonzentration des frischen Mediums, das heißt zu Beginn des Wachstums der inokulierten Saccharomyces-Zellen.

2) LD_{10} = Dosis, bei der unter den gewählten Kulturbedingungen 10 % der bestrahlten Zellen makroskopische Kolonien bilden.

tration des Vorkulturmediums dargestellt. Deutlich erkennbar durchläuft die Kurve für die LD_{10} bei dem auxotrophen Diplonten von etwa 1 % bis 4 % Glucose ein Minimum, während sich die Kurve bei dem prototrophen Diplonten von etwa 2 % Glucosegehalt ab einem Grenzwert nähert. Dieser Grenzwert bezeichnet die maximal aufzuwendende Strahlendosis zur neunzigprozentigen Inaktivierung dieses Stammes.

Ob auch für den auxotrophen Stamm ein solcher Grenzwert existiert, ist nicht erkennbar. Jedenfalls ist für den untersuchten Konzentrationsbereich kein Wendepunkt im Kurvenverlauf zu beobachten. Glucosekonzentrationen von mehr als 8 % wurden in die Untersuchungen nicht einbezogen.

Wie Abbildung 5 erkennen läßt, ist auch die LD_{10} des prototrophen homozygoten Diplonten nicht konstant, wenn die Glucosekonzentration des Vorkulturmediums variiert. Will man nun die Strahlenresistenz des Stammes 211-1aM/2 mit der dieses prototrophen Stammes 211-1a/2 vergleichen, so muß man beide zueinander in Beziehung bringen. Hierfür kann man das Verhältnis bilden aus der LD_{10} des auxotrophen Diplonten 211-1aM/2 und der LD_{10} des prototrophen Diplonten 211-1a/2.

Bildet man den Quotienten aus der LD_{10} des auxotrophen und der LD_{10} des prototrophen Diplonten, so erhält man bestimmte Werte der Dosisreduktion, die sich abhängig von der Glucosekonzentration des Vorkulturmediums verändern. Der so gebildete Dosisreduktionswert (künftig DRW genannt) ist bei geringen Glucosekonzentrationen >1 , bei etwa 0,5 % Glucose gleich 1 und dann von 0,5 % bis etwa 8 % <1 (vgl. Abbildung 5 und DRW-Tabelle Seite 47).

Da der Resistenzeffekt bei den von LASKOWSKI (1962a, 1962c) gewählten Bedingungen nicht bei den Haplonten beobachtet wurde, ist es interessant, die Strahlenempfindlichkeit der Haplonten in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Vorkulturmediums zu überprüfen.

Bestrahlt man die Zellen des prototrophen Stammes 211-1a und des entsprechenden haploiden auxotrophen Stammes 211-1aM, so kann man keinerlei Änderungen der Strahlenempfindlichkeiten in Abhängigkeit von der

Glucosekonzentration des Vorkulturmediums feststellen. Geprüft wurden auch hier die Glucosekonzentrationen von 0,1 bis 8 %. Innerhalb dieses Konzentrationsbereichs liegen die Punkte beider Haplonten unabhängig von der Glucosekonzentration bei $LD_{10} = 10$ krad.

Der negative Resistenzeffekt, wie er sich nach Anzucht der Saccharomyces-Zellen mit 0,5 bis etwa 8 % Glucose im Vorkulturmedium zeigte, tritt also - zumindest in diesem Glucose-Konzentrationsbereich - nur bei den Diplonten auf. Ob außerhalb dieser Konzentrationen eine Glucoseabhängigkeit der Röntgenempfindlichkeiten vorliegt, wurde nicht untersucht.

In der von LASKOWSKI aufgebauten Serie weitestgehend isogener und homozygoter Stämme ist ein Diplont vorhanden, der bis auf den heterozygoten Paarungstyp $\alpha\alpha$ mit dem auxotrophen Stamm 211-1aM/2 isogen ist (Stamm 230; siehe Stammsystem Seite 12). Für diesen Stamm war ein anderer, genetisch bedingter Resistenzeffekt von LASKOWSKI (1962b) beschrieben worden, der mit der Heterozygotie der Paarungstypallele verbunden ist. Dieser $\alpha\alpha$ -Effekt, der auch bei anderen Stämmen nachgewiesen wurde, schien unabhängig von dem mit der IV-Bedürftigkeit verbundenen Resistenzeffekt zu sein. Er vergrößerte den durch die IV-Bedürftigkeit hervorgerufenen Resistenzeffekt bei den von LASKOWSKI gewählten Vorkulturbedingungen (1 % Hefeextrakt, 0,25 % Glucose).

Variiert man die Glucosekonzentration in dem Vorkulturmedium, so zeigt dieser IV-bedürftige Diplont (Stamm 230), der also im Gegensatz zum völlig homozygoten Stamm 211-1aM/2 für die Paarungstypallele heterozygot $\alpha\alpha$, sonst aber mit dem auxotrophen Diplonten isogen ist, eine auffallende Stabilität seiner Strahlenresistenz. Wie in Abbildung 6 erkennbar, kann man innerhalb der untersuchten Konzentration von 0,25 bis 2 % Glucose im Vorkulturmedium, dem für den auxotrophen und auch für die Paarungstypallele homozygoten Diplonten 211-1aM/2 entscheidenden Konzentrationsbereich, keine Veränderung der Strahlenresistenz beobachten.

Der mit der IV-Bedürftigkeit verbundene Resistenzeffekt scheint sich also nur in einem ganz bestimmten, genetisch bedingten zellulären Milieu in Abhängigkeit von der Vorkultur ausprägen zu können. Schon die Veränderung in einem einzigen Gen kann die Ausprägung beeinflussen, wie die Versuche mit dem IV-bedürftigen, für die Paarungstypallele heterozygoten Stamm zeigen. Liegen nämlich die IV-Bedürftigkeit homozygot und die Paarungstypallele heterozygot vor, so wird durch den Einfluß beider Gene eine hohe Röntgenresistenz erzeugt (vergleiche Abbildung 6), die aber durch den bei dem völlig homozygoten IV-bedürftigen Stamm deutlich wirksamen Vorkultureinfluß der Glucosekonzentration nicht verändert werden kann.

HAWTHORNE u. FRIIS (1964) fanden für den IV-auxotrophen Haplon-ten 211-1aM, daß er in der Lage ist, auf einem Isoleucin- und Valin-freien synthetischen Medium zu wachsen, wenn man den osmotischen Druck im Medium beträchtlich erhöht. So wuchsen die Zellen des Stammes 211-1aM beispielsweise auf einem synthetischen Medium, dem mindestens 0,5 m KCl zugesetzt war. Die Zellen waren "osmotisch geheilt" (HAWTHORNE u. FRIIS). Sie verhielten sich also auf diesem Medium bezüglich der Koloniebildungsfähigkeit wie die Zellen des prototrophen haploiden Ausgangstammes 211-1a.

Unter den 30 IV-bedürftigen Mutanten, die HAWTHORNE u. FRIIS untersuchten, fanden sich neben der Mutante 211-1aM nur noch zwei andere, die sich als "osmotisch heilbar" erwiesen. Die relativ seltene Erscheinung der osmotischen Heilbarkeit trat jedoch auch bei anderen Mutationen in Saccharomyces auf ¹). HAWTHORNE u. FRIIS interpretierten die osmotisch heilbaren Mutanten "als Missens-Mutanten, welche ein abnorm gefaltetes Protein als Folge einer einzelnen Aminosäuresubstitution" bilden. Mit der Erhöhung des osmotischen Drucks kann dann entweder "das Unvermögen, unter normalen Bedingungen eine essentielle Bindung zu formen, an der die substituierte Aminosäure beteiligt ist" wieder aufgehoben werden, oder es kann "eine unerwünschte Bindung, die früh in der Faltung des Proteins auftritt und so zu einer FehlAusrichtung des Polypeptids für die Bildung der folgenden Bindungen führt" wieder beseitigt werden.

¹) Es wurden auch osmotisch heilbare Adenin-, Histidin-, Threonin- und Tyrosin-bedürftige Mutanten beschrieben.

Auch die etwa zehnfach erhöhte Glucosekonzentration im Medium, wie sie im Vorkulturmedium bei Auftreten des negativen Resistenzeffektes (etwa von 2 bis 4 % Glucose) gegenüber dem des Resistenzeffektes (0,25 % Glucose) vorliegt, bewirkt einen erhöhten osmotischen Druck. So wurden, zusammen mit dem osmotischen Partialdruck von jeweils 1 % Hefeextrakt, bei 0,25 % Glucose im flüssigen Medium 1,9 Atm und bei 2,0 % Glucose 4,3 Atm gemessen.

Ein wichtiger Unterschied zwischen dem Einfluß auf die Saccharomyces-Zellen, den der osmotische Druck infolge der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium ausüben kann und dem Einfluß, den der osmotische Druck infolge der KCl-Anwesenheit im Wachstumsmedium ausüben kann, fällt jedoch sofort auf: Der osmotische Druck infolge der Glucosekonzentration ist nicht konstant. Die Glucosekonzentration im Medium nimmt während der Vermehrung der Saccharomyces-Zellen ständig ab und bei 1 % Hefeextrakt scheint noch die Glucose bei den betreffenden Konzentrationen im Medium der wachstumsbegrenzende Faktor zu sein, das heißt sie ist im Vorkulturmedium beim Erreichen der stationären Phase der Saccharomyces-Kultur verbraucht (siehe hierzu beispielsweise POHLIT, LASKOWSKI u. LOCHMANN, 1966).

Ein erhöhter osmotischer Druck infolge der Glucosekonzentration ist also unter den gewählten Bedingungen nach spätestens 24 Stunden (Ende der logarithmischen Wachstumsphase, Beginn der stationären Phase) abgebaut. Die Zellen befinden sich dann aber bis zur Bestrahlung noch etwa 48 Stunden in der stationären Phase bei nicht erhöhtem osmotischen Druck.

Nimmt man beispielsweise an, daß während der letzten 2 Teilungsschritte der Zellen in dem Medium die Glucose schon so weit verbraucht war, daß ein zur osmotischen Heilung notwendiger Druck nicht mehr aufrecht erhalten wurde, so bedeutet das, daß etwa 75 % aller Zellen in der Kultur des Stammes 211-1aM/2 stets, auch phänotypisch, IV-auxotroph gewesen sind.

Man muß also annehmen, daß nur ein kleiner Anteil der Population auxotropher Zellen in einer frühen Wachstumsphase der Kultur als osmotisch geheilt angesehen werden kann, was bedeutet, daß nur ein kleiner Populationsanteil auxotropher Zellen in einer sehr frühen Phase des Wachstums der Kultur im Stoffwechsel dem der prototrophen ähnlich oder gleich gewesen sein kann.

Um zu überprüfen, ob trotz dieser Einschränkungen eine Beeinflussung der Stoffwechselprozesse durch Veränderung des osmotischen Drucks einen Einfluß auf die Strahlenresistenz der Zellen hat, wurden einige Versuche mit Osmoregulatorien unternommen.

Will man erreichen, daß während der gesamten Zeit des Wachstums im Vorkulturmedium ein relativ gleichmäßig erhöhter osmotischer Druck herrscht, muß man dem Medium Substanzen zusetzen, die von den Zellen nicht verbraucht werden können, die aber möglichst keinen Einfluß auf den Stoffwechsel der Zellen haben sollten.

Für bestimmte Hefen ist bekannt, daß sie, auch nach einer Adaptationszeit, bestimmte Zucker nicht verwerten können. Insbesondere können viele Hefen Pentosen als Kohlenstoffquelle nicht verwerten (vergleiche beispielsweise UHL, 1960). In Vorversuchen erwies sich eine Pentose, die D(+)-Xylose [p.A. (Serva)], im folgenden Xylose genannt, als gutes Osmoregulans. Sie konnte von den haploiden Stämmen 211-1a und 211-1aM und den Diplonten 211-1a/2 und 211-1aM/2 als Kohlenstoffquelle nicht verwertet werden und zwar weder allein, noch mit Unterstützung durch Glucose zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels.

Bei Wachstumsversuchen wurde auf SM-Agar (siehe Seite 17) mit Xylose anstelle von Glucose nach 21 Tagen kein Koloniebildungsvermögen der auf dem Agar liegenden Zellen festgestellt. Bei Wachstumsversuchen in SM + Xylose + Glucose hing der meßbare Endtiter an gewachsenen Zellen allein von der anfangs vorhandenen Glucosemenge ab. Fehlte die Glucose im Medium, so konnte innerhalb von 7 Tagen nur eine reichliche Verdopplung der Extinktion (= Verdopplung des Zelltiters oder des Zellvolumens) beobachtet werden. Auch die Zellen, die in SM + Glucose + Xylose gewachsen waren, zeigten auf SM-Agar + Xylose - Glucose nach 21 Tagen keine Koloniebildungsfähigkeit.

Die herrschenden osmotischen Drucke in den flüssigen Medien mit verschiedenen Glucosekonzentrationen wurden mit einem Mikro-Osmometer der Fa. KNAUER (Berlin) bestimmt ¹⁾. Anschließend wurden flüssige Kulturmedien mit geringer, definierter Glucosekonzentration hergestellt, bei denen ein zusätzlicher osmotischer Druck durch die Zugabe von molekulargewichts-äquivalenten Mengen an Xylose erzielt wurde. Der so schließlich gewonnene osmotische Druck entsprach dann dem Druck einer vergleichbaren, höheren Glucosekonzentration.

Werden nun Zellen der diploiden Saccharomyces-Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 röntgenbestrahlt, nachdem sie in Vorkulturmedien gezüchtet worden waren, denen zwecks Erhöhung des osmotischen Drucks bestimmte Glucose äquivalente Mengen Xylose zugegeben waren, so besitzen sie eine Strahlenresistenz, die sich nur nach der bereits beschriebenen Glucoseabhängigkeit richtet.

Abbildung 7 zeigt am Beispiel der Inaktivierung der Zellen des auxotrophen Diplonten 211-1aM/2, daß die Überlebenswahrscheinlichkeit von der Partialkonzentration der Glucose im Vorkulturmedium ²⁾ abhängt. Nach einer Vorkultur mit niedriger Glucosekonzentration, nämlich 0,1 %, aber erhöhtem osmotischen Druck, nämlich demjenigen, der 2 % Glucose entspricht ²⁾, besitzen die Zellen einen Resistenzgrad, der demjenigen nach 0,1 % Glucose im Vorkulturmedium ohne zusätzliche Erhöhung des osmotischen Drucks entspricht.

Der Resistenzeffekt ist also mit den hier angewandten Methoden in der Vorkultur osmotisch nicht beeinflussbar, zumindest nicht bei den gemessenen osmotischen Drucken von 1,9 bis 4,3 Atm, die denen von 0,1 % bis 2 % Glucose + 1 % Hefeextrakt im Vorkulturmedium ²⁾ entsprechen.

¹⁾ Den Herren Dr. K. Graszynski und Dr. R. Keller danke ich für die hierbei gewährte Unterstützung.

²⁾ Konzentration im frischen Medium, das heißt zu Beginn des Wachstums der inokulierten Saccharomyces-Zellen.

HOMMES (1965, 1966) zeigte bei Saccharomyces carlsbergensis, "daß während der aeroben Glykolyse in der Kinetik der Carrier der Atmungskette in einer Hefe, die mit 0,6 oder 2 % Glucose im Medium gewachsen war, Unterschiede existieren, die auf einen Unterschied im Kontrollmechanismus während der aeroben Glykolyse hinweisen".

Man kann daher annehmen, daß in den Zellen beim Wachstum in Medien mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen auch Stoffwechselunterschiede auftreten können, die die Strahlenresistenz beeinflussen. Abhängig oder unabhängig von den bei höheren Glucosekonzentrationen anderen Kontrollmechanismen der aeroben Glykolyse könnte es bei einer Röntgenbestrahlung der Saccharomyces-Zellen, die in einem Vorkulturmedium mit $\leq 0,5$ % Glucose aufgewachsen waren, zu einer anderen Strahlenreaktion kommen, als bei denen, die im Medium mit $> 0,5$ % Glucose aufgewachsen waren.

Man könnte daher vermuten, daß die aerobe Glykolyse für die Röntgenreaktion der Zellen von Einfluß ist. So erscheint es nicht unplausibel anzunehmen, daß die Zellen eines Saccharomyces-Stammes, die die angebotene Glucose nicht auf dem Wege der aeroben Glykolyse verwerten können, eine andere Strahlenempfindlichkeit besitzen, als die Zellen des gleichen Stammes, die zur aeroben Glykolyse fähig sind.

Die Richtigkeit dieser Annahme kann man prüfen, wenn man die Strahlenempfindlichkeit einer atmungsdefekten IV-auxotrophen "petite"-Mutante des auxotrophen Diplonten 211-1aM/2 (siehe Seite 14) testet. Diese Mutante ist also nicht in der Lage, die Glucose auf dem Wege der aeroben Glykolyse zu verwerten, sondern kann den angebotenen Zucker nur vergären.

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, zeigt diese "petite"-Mutante (Stamm 211-1aM/2p₁) nach einer dreitägigen Vorkultur in YG (siehe Seite 15) keinen Unterschied in der Strahlenresistenz im Vergleich zum atmungsfähigen Ausgangsstamm. Um auszuschließen, daß der IV-bedürftige Stamm selbst schon atmungsunfähig ist und aus diesem Grunde kein Unterschied in der Strahlenresistenz zum atmungsdefekten Stamm 211-1aM/2p₁ zu beobachten ist, kann man die Atmungsintensität messen.

Mißt man den Sauerstoffverbrauch, der als ein Maß der Atmungsaktivität der Zellen und damit der Stärke der aeroben Glykolyse angesehen werden kann (vergleiche beispielsweise HEMPEL, 1964), bei dem auxotrophen Diplonten 211-1aM/2 und vergleichend hierzu bei dem atmungsfähigen prototrophen Diplonten 211-1a/2 im WARBURG-Apparat ¹), so kann man keine deutlichen Unterschiede zwischen dem O₂-Verbrauch der Zellen des auxotrophen und des prototrophen Vergleichsstammes beobachten. Das heißt, man kann keine Unterschiede beobachten, die über eine Abweichung von 15 % der Höhe des O₂-Verbrauchs des prototrophen Diplonten hinausgehen.

In Abbildung 9 ist ein typischer Versuch mit Zellen aus der beginnenden stationären Wachstumsphase (nach 24 Stunden Wachstum in YG) wiedergegeben. Zur Kontrolle sind in diesem Versuch auch Zellen des atmungsdefekten auxotrophen Stammes 211-1aM/2p₁ getestet worden. Sie zeigten innerhalb des Untersuchungszeitraumes keinen meßbaren O₂-Verbrauch.

Wie die bisherigen Experimente gezeigt haben, ist der Resistenzeffekt stark von der Konzentration der Kohlenstoffquelle Glucose im Vorkulturmedium abhängig. Dieser "Glucose-Effekt" scheint nicht auf die Veränderung des osmotischen Drucks im Medium infolge der Veränderung der Glucosekonzentration zurückführbar zu sein. Röntgeninaktivierungsexperimente mit einer atmungsdefekten auxotrophen Mutante des IV-bedürftigen Diplonten 211-1aM/2 und vergleichende Messungen des Sauerstoffverbrauchs der Zellen der Stämme 211-1a/2, 211-1aM/2 und 211-1aM/2p₁ machen darüber hinaus wahrscheinlich, daß Prozesse der aeroben Glykolyse bei dem IV-bedürftigen Diplonten auf die Strahlenreaktion keinen bedeutsamen Einfluß ausüben. Es müssen also andere Einflüsse der Glucose sein, die für den Konzentrationseffekt dieses Zuckers verantwortlich sind.

¹) Frau Dipl.-Biol. Jannsen-Hempel danke ich für die hierbei gewährte Unterstützung.

Um zu sehen, ob auch andere von den Zellen verwertbare Kohlenhydrate gleichartige Konzentrationseffekte wie die Glucose zeigen, wurden Versuche durchgeführt, in denen das Vorkulturmedium unterschiedliche Konzentrationen von Natriumlactat (Riedel de Haën) enthielt. Es zeigte sich, daß sich bei Röntgeninaktivierungsversuchen nach Anzucht der Zellen in einem Hefeextraktmedium (1 %) mit geringen Natriumlactatkonzentrationen der bekannte Resistenzeffekt einstellt. Erhöht man aber die Lactatkonzentration bis zu einer Konzentration, bei der äquimolare Mengen Glucose den maximalen negativen Resistenzeffekt verursachen, so verändert sich lediglich die Strahlenresistenz des auxotrophen Diplonten 211-1aM/2. Die Empfindlichkeit des prototrophen Diplonten 211-1a/2 bleibt dagegen praktisch gleich. Da der Resistenzverlust des auxotrophen Stammes nicht so stark wie bei einer zweiprozentigen Glucosevorkultur ist, tritt der negative Resistenzeffekt nicht auf und der Resistenzeffekt bleibt erhalten.

Auf Abbildung 10 ist das Verhalten des Resistenzeffektes nach Anzucht der Zellen in 1 % Hefeextraktmedien mit 1 % und mit 2 % Glucose äquivalenten Mengen Natriumlactat dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die die Strahlenresistenz modifizierende Wirkung nicht generell von der Konzentration der angebotenen Kohlenstoffquelle abhängt, sondern spezifisch für die Glucose zu sein scheint. Der Konzentrationseffekt der Glucose erinnert an Befunde von WITT, KRONAU u. HOLZER (1966) bei Saccharomyces cerevisiae, die nachwiesen, daß verschiedene Enzymsynthesen durch Glucose reprimiert werden und daß zunehmende Hemmung der Synthese mit zunehmender Glucosekonzentration im Inkubationsmedium auftreten kann. Jedoch hat nicht nur die Glucosekonzentration im Vorkulturmedium einen Einfluß auf die Strahlenresistenz, sondern, wie die im nächsten Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen, auch die andere Mediumkomponente, der Hefeextrakt.

3.1.1.2. Variation des Hefeextraktes im Vorkulturmedium

Auch die Konzentration des Hefeextraktes im Vorkulturmedium ist für die Strahlenresistenz der Zellen der Saccharomyces-Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 von Bedeutung. Beläßt man nämlich die Konzentration der Glucose im Vorkulturmedium bei 2 %, verändert aber die Konzentration an zugesetztem Yeast-Extract (Difco), so ist ein ähnliches Verhalten des Resistenzeffektes wie bei der Glucosevariation zu beobachten. Zwischen den Werten 1 % und 0,05 % Hefeextrakt im Vorkulturmedium verändern sich die Strahlenempfindlichkeiten beider Diplonten derart, daß es auch hier in Abhängigkeit von der Hefeextraktkonzentration im Vorkulturmedium zu einer Umkehr der Empfindlichkeitsverhältnisse kommt.

Bei 1 % Hefeextrakt und 2 % Glucose ist der auxotrophe Diplont relativ strahlenempfindlicher als der prototrophe Diplont (vergleiche Abbildung 3), der DRW ist hier also < 1 . Mit abnehmender Hefeextraktkonzentration wird der DRW dann aber größer und ist bei etwa 0,75 % = 1, um bei weiter fallender Konzentration sogar > 1 zu werden.

Überprüft man den Einfluß der Hefeextraktkonzentration in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Vorkulturmediums auf die Strahlenreaktion der beiden Diplonten und trägt den Quotienten der Strahlenempfindlichkeiten der beiden Stämme, ausgedrückt durch den Dosisreduktionswert, in ein dreidimensionales Raster ein, auf dessen drei Achsen der DRW, die Konzentration an Yeast-Extract und die Glucosekonzentration aufgetragen sind, so ergibt sich ein anschauliches Bild des Zusammenspiels der Mediumkomponenten in der Vorkultur.

In Abbildung 11 ist dieses Zusammenspiel dargestellt. In dieser Darstellung in Perspektivprojektion (Projektionswinkel 45° bzw. 60°) ist im "Bildvordergrund" ein senkrechter Schnittpunkt der Achse für die Yeast-Extract-Konzentration mit der Achse für die Glucosekonzentration zu sehen, der bei 1 % Yeast-Extract und 2 % Glucose liegt. Senkrecht zu diesen beiden Achsen steht auf ihrem Schnittpunkt als Ordinate die DRW-Achse.

Bei 1 % Yeast-Extract und 2 % Glucose im Vorkulturmedium stellt sich bei Inaktivierungsexperimenten der negative Resistenzeffekt ein. Das bedeutet also, daß auf der Ordinate im "Bildvordergrund" der DRW an dieser Stelle <1 ist. Dieser Dosisreduktionswert, der stets den Quotienten aus der LD_{10} des Stammes 211-1aM/2 durch die LD_{10} des Stammes 211-1a/2 darstellt (siehe Definition des DRW), ist innerhalb der untersuchten Konzentrationsbereiche an dieser Stelle ungefähr am kleinsten (siehe hierzu auch die DRW-Tabelle Seite 47).

Auf der von der DRW-Achse und der Glucose-Achse bei 1 % Yeast-Extract begrenzten Ebene werden also die Dosisreduktionswerte von 2 % bis 0,1 % Glucose mit abnehmender Glucosekonzentration größer - zwischen 2 % und etwa 0,75 % nur wenig und zwischen 0,75 % und 0,1 % verhältnismäßig stark -; und auch auf der von der DRW-Achse und der Yeast-Extract-Achse bei 2 % Glucose begrenzten Ebene werden die Dosisreduktionswerte größer, wenn die Konzentration an Yeast-Extract im Vorkulturmedium von 1 % auf 0,05 % sinkt. Enthält beispielsweise das Vorkulturmedium bei 2 % Glucose statt 1 % Yeast-Extract (hier negativer Resistenzeffekt, $DRW < 1$) nur 0,1 % Yeast-Extract, so ist der auxotrophe Diplont wieder strahlenresistenter als der prototrophe, das heißt bei Röntgeninaktivierungsexperimenten stellt sich trotz 2 % Glucose wieder der Resistenzeffekt ein.

Weitere Untersuchungen über die Abhängigkeit des DRW von der Glucose- und der Yeast-Extract-Konzentration im Vorkulturmedium zeigten, daß bei geringen Konzentrationen einer oder beider Mediumkomponenten stets Dosisreduktionswerte >1 auftraten. Das bedeutet, daß zwischen 0,05 % bis 0,75 % Hefeextrakt und 0,1 % bis 0,5 % Glucose der auxotrophe Diplont strahlenresistenter als der prototrophe ist. Für die Abbildung 11 heißt das, daß der "Bildhintergrund" zwischen den Werten 0,05 % bis 0,75 % Hefeextrakt und 0,1 % bis 0,5 % Glucose von DRW-Werten >1 ausgefüllt wird.

Bei einer Konzentration der Mediumkomponenten, die relativ gering ist, stellt sich also jeweils der Resistenzeffekt ein. Auch wenn eine der beiden Komponenten relativ hoch konzentriert vorliegt, die jeweilige andere aber nur relativ gering konzentriert ist, stellt sich der

Resistenzeffekt ein. Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, daß ein gewisser "Aushungerungseffekt" zur Erzielung einer relativ hohen Strahlenresistenz bei dem auxotrophen Diplonten von Bedeutung sein könnte.

Bei Erhöhung der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium über 2 % hinaus bleibt bis etwa 4 % der negative Resistenzeffekt erhalten, wenn die Hefeextraktkonzentration 1 % beträgt. Der DRW ist also hier ebenfalls ≤ 1 . Bei 8 % Glucose hat die Strahlenempfindlichkeit des Stammes 211-1aM/2 wieder so stark abgenommen, daß sich bei Röntgeninaktivierungsexperimenten eine etwa gleich große Resistenz wie bei dem Stamm 211-1a/2 einstellt, so daß der DRW an dieser Stelle gleich 1 ist. (siehe Abbildung 5 und DRW-Tabelle Seite 47). Der negative Resistenzeffekt ist hier also aufgehoben.

In Ergänzung zu Abbildung 11 hieße das, daß die Kurve, die auf der Ebene von 1 % Yeast-Extract die Glucose-Abhängigkeit des DRW wiedergibt, über 2 % hinaus bis etwa 4 % Glucose durch ein Minimum läuft und bei 8 % Glucose bis $DRW = 1$ angestiegen ist.

Eine entsprechende Untersuchung der Yeast-Extract-Abhängigkeit des DRW auf der Ebene von 2 % Glucose über 1 % Yeast-Extract hinaus wurde nicht unternommen.

An dieser Stelle sei noch einmal betont, daß die Haplonten 211-1a und 211-1aM, die Ausgangsstämme der Diplonten 211-1a/2 und 211-1aM/2, keine Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit von der Konzentration der Mediumkomponenten im Vorkulturmedium zeigten, wie Untersuchungen mit unterschiedlicher Glucosekonzentration im Vorkulturmedium erwiesen (siehe hierzu Seite 34). Wollte man diese Ergebnisse in Form der Abbildung 11 darstellen, so würde man also für den $DRW = \frac{LD_{10} \text{ 211-1aM}}{LD_{10} \text{ 211-1a}}$ für die Glucoseabhängigkeit bei 1 % Yeast-Extract Punkte abbilden, die alle auf einer Geraden bei $DRW = 1$ lägen. Die Abbildung des Kurvenverlaufs der LD_{10} eines haploiden Stammes in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Vorkulturmediums würde die Darstellung einer Geraden sein.

Die in Abbildung 11 zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse zur Abhängigkeit der Strahlenresistenz der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 von der Konzentration der Glucose und des Hefeextrakts im Vorkulturmedium zeigen, daß beim Stamm 211-1aM/2 die resistenzmindernde Wirkung der Glucose bei Konzentrationen zwischen 0,5 % und 2 % (siehe hierzu auch Abbildung 5) sich nur bei Hefeextraktkonzentrationen von $\geq 0,75$ % ausprägt. Bei niedrigeren Hefeextraktkonzentrationen entfaltet die Glucose keine Hemmwirkung.

Wie die Versuche mit Natriumlactat anstelle von Glucose im Vorkulturmedium zeigten, bewirken aber Hefeextraktkonzentrationen von $\geq 0,75$ % selbst keine deutliche Resistenzverminderung. Wie die Versuche zeigten (siehe Seite 42 und Abbildung 10), bleibt der Resistenzeffekt unabhängig von der Lactatkonzentration im Vorkulturmedium innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs erhalten. Der auxotrophe Diplont behält also seine relative Strahlenresistenz gegenüber dem prototrophen Diplonten, der DRW bleibt ≥ 1 .

Diese Befunde zeigten, daß es zur Ausprägung des Resistenzeffektes auf die gemeinsame Anwesenheit beider Komponenten im Vorkulturmedium ankommt, auf die Glucose und auch auf den Hefeextrakt. Diese Ergebnisse stimmen überein mit denen von HAEFNER (1965), der für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach vierzehntägiger Vorkultur auf VM-Agar (siehe Seite 15) und Nachkultur auf SM-Agar (siehe Seite 17), dem Serin zugesetzt war, ebenfalls eine Umkehr der Empfindlichkeitsverhältnisse gegenüber denen nach Vorkultur in YG (siehe Seite 15) fand.

Die Ergebnisse von HAEFNER lassen sich ebenfalls auf den Einfluß der Glucose und des Hefeextraktes im VM-Vorkulturmedium zurückführen. Zusätzlich, im Rahmen dieser Arbeit unternommene Untersuchungen zur Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Alter der vorkultivierten Zellen zeigten, daß die Zellen der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 zwischen 3 und 21 Tagen Vorkultur auf VM-Agar keinen Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit zeigten.

Die Befunde, welche aufzeigten, daß es zur Ausprägung des Resistenzeffektes auf die gemeinsame Anwesenheit von Glucose und Yeast-Extract im Vorkulturmedium ankommt, werden auch von den im folgenden Abschnitt

dargestellten Ergebnissen bestätigt. Diese zeigen, daß sich auch nach 2 % Glucose im Vorkulturmedium der Resistenzeffekt einstellt, wenn im Medium kein Hefeextrakt vorhanden ist. Der auxotrophe Diplont behält also unter diesen Umständen seine relative Strahlenresistenz gegenüber dem prototrophen Diplonten; der DRW bleibt weiterhin > 1 .

Yeast Extract (Difco)	Glucose	LD ₁₀ 211-1aM/2	LD ₁₀ 211-1a/2	D R W	Zahl der ausgewerteten Experimente
		in krad	in krad		
1,0 %	0,1 %	56,5 "	32 "	1,77	2
1,0 %	0,25 %	58 "	33 "	1,76	32
1,0 %	0,5 %	34 "	42,5 "	0,79	5
1,0 %	0,75 %	31,5 "	39 "	0,81	1
1,0 %	1,0 %	30,5 "	46,5 "	0,65	2
1,0 %	1,5 %	30 "	48,5 "	0,62	2
1,0 %	2,0 %	29,5 "	49 "	0,60	3
1,0 %	4,0 %	31 "	54 "	0,57	2
1,0 %	8,0 %	49,5 "	49,5 "	1,00	2
0,05 %	2,0 %	58 "	28 "	2,06	2
0,1 %	2,0 %	59 "	28,5 "	2,07	2
0,5 %	2,0 %	56,5 "	32 "	1,77	2
0,75 %	2,0 %	43 "	42 "	1,02	1
1,0 %	2,0 %	29,5 "	49 "	0,60	3
0,1 %	0,5 %	57,5 "	30 "	1,91	2
0,5 %	0,5 %	53 "	35 "	1,51	1
0,75 %	0,5 %	50 "	40 "	1,25	1
1,0 %	0,5 %	34 "	42,5 "	0,79	5
0,1 %	0,25 %	67 "	32 "	2,09	1
0,5 %	0,25 %	63,5 "	33,5 "	1,89	1
1,0 %	0,25 %	58 "	33 "	1,76	32

Tabelle 1.

Dosisreduktionswerte, berechnet nach $DRW = \frac{LD_{10} \text{ 211-1aM/2}}{LD_{10} \text{ 211-1a/2}}$, sowie die verschiedenen LD₁₀ für die Stämme 211-1aM/2 und 211-1a/2 bei verschiedenen Anfangskonzentrationen an Hefeextrakt und Glucose im Vorkulturmedium (siehe auch Abbildung 11).

3.1.1.3. Variationen der Mediumkomponenten in synthetischen Vorkulturmedien

Die bisherigen Ergebnisse, insbesondere die Abhängigkeit des DRW von Glucose und Hefeextrakt, lassen die Deutung zu, daß im Hefeextrakt eine zur Beeinflussung der Strahlenresistenz der untersuchten homozygoten Diplonten wichtige Komponente enthalten ist. Diese Komponente kann wirksam werden bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose.

Eine Möglichkeit, die entscheidende(n) Komponente(n) - in Zusammenwirkung mit der Glucose - zu identifizieren, kann die Verwendung von synthetischen Vorkulturmedien bieten. In einem solchen synthetischen Medium ist der komplexe Hefeextrakt durch eine Anzahl von Substanzen in bekannten Konzentrationen ersetzt, die für Wachstum und Vermehrung der untersuchten Stämme notwendig sind. Ein solches synthetisches Medium (künftig SM genannt) wurde auf Seite 17 beschrieben.

Die in diesem Medium gelösten Substanzmengen können, - mit Ausnahme der Glucosekonzentration von 2 % -, insgesamt als ungefähre Minimalmengen angesehen werden ¹). Bei ihrer gemeinsamen Verringerung ist das Wachstum jeder koloniebildungsfähigen Zelle nicht mehr garantiert. Das bedeutet beispielsweise, daß bei vergleichenden Wachstumstests zwischen Zellen auf VM-Agar und auf subminimalem SM-Agar die Zahl der auf dem SM-Agar aufwachsenden Zellen bei gleichem Anfangstitier kleiner als auf VM-Agar ist. Es erscheint daher zulässig, die Konzentration des "Hefeextrakt-Ersatzes" als Einheit mit einer Minimalkonzentration an Yeast-Extract zu vergleichen, wenn man z. B. unterstellt, daß eine (od. mehrere) der im SM verwendeten Substanzen als wachstumsbegrenzender Faktor nicht mehr verringert werden darf (oder dürfen).

Züchtet man nun den Stamm 211-1a/2 und den Stamm 211-1aM/2 in SM + 0,25 % Glucose vor und inaktiviert die Zellen nach dieser Vorkultur in der bekannten Weise, so zeigen beide Diplonten das bereits von LASKOWSKI (1962a) beschriebene Resistenzverhalten (Abbildung 12a). Erhöht man nun die Konzentration der Glucose bis zu Werten, bei denen

¹) Dem SM waren noch einige für Wachstum und Vermehrung der untersuchten Saccharomyces-Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nicht notwendige Substanzen, beispielsweise Aminosäuren sowie Adenin und Uracil, zugesetzt.

nach Yeast-Extract-Glucose Vorkulturmedien der negative Resistenz-effekt verzeichnet wird, so ist nach einer Vorkultur in dem hier verwendeten synthetischen Medium keine Veränderung der Strahlenempfindlichkeiten der Diplonten zu beobachten (Abbildung 12 b).

Weitere Untersuchungen über die Abhängigkeit des DRW von der Konzentration der Komponenten des synthetischen Mediums bei konstanter Glucosekonzentration von 2 % liefern ebenfalls nur negative Ergebnisse. Von einfacher bis zehnfacher Minimalkonzentration an SM in dem Vorkulturmedium ist kein Unterschied der Strahlenempfindlichkeiten der Saccharomyces-Stämme zu beobachten (siehe Abbildung 12c in Verbindung mit 12b und 12a). Wie man auch die Vorkulturkonzentration verändert, immer ist der Verlauf der Inaktivierungskurven der so vorgezüchteten Stämme etwa gleich und der daraus gewonnene DRW > 1 .

Man kann sicher annehmen, daß eine zehnfache Minimalkonzentration des SM schon ein reichliches Angebot der Substanzen darstellt, die für Wachstum und Vermehrung der untersuchten Diplonten notwendig sind. Wenn sich hier also trotzdem bei Inaktivierungsexperimenten der Resistenzeffekt einstellt, scheint - zumindest nach Vorkulturen in diesem Medium - ein "Mangelzustand" oder ein "Aushungerungseffekt" in den Zellen (siehe Seite 45) die Ausprägung des Resistenzeffektes nicht zu beeinflussen.

Diese Befunde lassen sich jedoch erklären, wenn man annimmt, daß in dem SM eine (oder mehrere) Substanz(en) fehlt (fehlen), die im Hefeextrakt enthalten ist (sind) und die in Kombination mit Glucose bei relativ hohen Konzentrationen hemmend auf einen im auxotrophen homozygoten Diplonten wirksamen Reparaturprozess wirkt (wirken).

Auch dem pH-Wert des Mediums könnte eine beeinflussende Rolle zugeschrieben werden. Es wäre denkbar, daß die im SM als fehlend angenommene(n) Substanz(en) vorhanden ist (sind), aber bei der hohen Azidität des SM blockiert oder inaktiviert wird (werden)? Wie pH-Messungen unverbrauchter Medien ergaben (siehe Seite 16), ist das synthetische

* Ergänzend hierzu siehe 4., Seiten 78 - 80 und Abbildungen 25 u. 24

Medium beträchtlich saurer als das Hefeextrakt-Medium (mit $\text{pH} = 6,5 \pm 0,2$) und sein pH liegt unabhängig von der Glucosekonzentration bei $\text{pH} = 3,5 \pm 0,2$, während das zehnfach angereicherte SM sogar den $\text{pH} = 3,3 \pm 0,2$ aufweist.

Zusammenfassend kann man, was die lange Zeit vor der Bestrahlung beginnenden Einflüsse betrifft, feststellen:

Die Ausprägung des Resistenzeffektes ist deutlich abhängig von der Konzentration des Hefeextraktes in Kombination mit der Konzentration der Glucose. Der auxotrophe Diplont 211-1aM/2 ist strahlenresistenter als der prototrophe Diplont 211-1a/2, wenn die Glucosekonzentration $> 0,5 \%$ und die Hefeextrakt-Konzentration $> 0,75 \%$ ist. Er wird strahlenempfindlicher als der prototrophe Diplont, wenn bei Hefeextrakt-Konzentrationen von $> 0,75 \%$ die Glucosekonzentration größer als $0,5 \%$ ist. Bei 8% Glucose und 1% Hefeextrakt sind beide Stämme gleich empfindlich.

Ohne Einfluß innerhalb des untersuchten Bereichs ist der osmotische Druck, den die Glucose bei $0,1 \%$ bis 2% im Vorkulturmedium bewirkt. Auch die Fähigkeit zur aeroben Glykolyse scheint die Ausprägung des Resistenzeffektes nicht zu beeinflussen. Eine atmungsdefekte Mutante des resistenten auxotrophen Stammes 211-1aM/2, der Stamm 211-1aM/2p₁, ist gleichfalls röntgenresistent.

Eine im Genom vorhandene Heterozygotie der Paarungstypallele "stabilisiert" den Resistenzgewinn, der mit der IV-Auxotrophie verbunden ist, und verhindert innerhalb der untersuchten Konzentrationen der Glucose und des Hefeextrakts das Auftreten des negativen Resistenzeffektes.

3.2.

UMWELTEINFLÜSSE RELATIV KURZE ZEIT
VOR DER BESTRAHLUNG

Um mit Hilfe anderer, möglicherweise einflußreicher Parameter weitere Aufschlüsse über die Ausprägung des Resistenzeffektes zu erhalten, sollen auch verschiedene Einflüsse untersucht werden, die relativ kurze Zeit vor der Bestrahlung beginnen. Werden solche gefunden, könnten sie - beispielsweise in Verbindung mit Vorkulturverfahren - möglicherweise neue Einblicke in den Mechanismus, der verantwortlich für die Ausprägung des Resistenzeffektes ist, gestatten.

Zu diesem Zweck soll der Einfluß von zwei Substanzen untersucht werden, deren Wirksamkeit bei Bestrahlungen mit ionisierenden Strahlen schon vielfach beschrieben wurde. Die eine Substanz verringert bei Anwesenheit während einer Bestrahlung das Ausmaß der Strahlenschäden, die andere vergrößert es im allgemeinen.

3.2.1. Versuche mit der Strahlenschutzsubstanz L-Cystein

Die Zellen der Saccharomyces-Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nehmen die als wirksame Strahlenschutzsubstanz bekannte Aminosäure Cystein auf. Wie für den Stamm 211-1a/2 gezeigt wurde, stellt sich der optimal erreichbare Strahlenschutz aber erst nach einer etwa zehnminütigen Inkubation in einer 0,01 molaren Cysteinlösung ein, wobei die Vorkultur für die Menge des in die Zellen aufgenommenen Cysteins von großer Bedeutung ist. Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase nehmen etwa 15mal mehr Cystein pro Zeiteinheit auf, als die Zellen aus der stationären Phase, ohne jedoch durch die größere Menge Cystein stärker strahlengeschützt zu sein (SCHÄDEL, LOCHMANN u. LASKOWSKI, 1966).

Bietet man den Zellen der beiden Diplonten aus der stationären Wachstumsphase ¹⁾ 0,01 molares L-Cysteinhydrochlorid (Serva) 30 Minuten vor der Röntgenbestrahlung an und beläßt sie auch während der Bestrahlung

¹⁾ Drei Tage Wachstum in YG (siehe Seite 15), nach welchen sich also der Resistenzeffekt einstellt.

in der Cysteinlösung, so zeigen sie eine deutliche Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit verglichen mit den nicht Cystein-behandelten Zellen. In Abbildung 13 ist der Verlauf der Inaktivierungskurven bei der Diplonten mit und ohne Cysteinschutz aufgezeichnet. Man erkennt, daß der Strahlenschutz bei beiden Stämmen etwa gleich groß ist. Für beide Diplonten wird also eine etwa gleichgroße Dosisreduktion ¹⁾ durch diese Strahlenschutzsubstanz erzielt. Eine unterschiedliche Beeinflussung der Mechanismen, die den Resistenzeffekt bewirken, scheint also auf diesem Wege nicht möglich zu sein.

3.2.2. Versuche zum Sauerstoffeffekt bei Bestrahlungen

Verdrängt man eine genügend lange Zeit vor der Bestrahlung (vergleiche BEAM, 1955) den Sauerstoff in der Bestrahlungssuspension mit reinem ³⁾ Stickstoff und bestrahlt die so suspendierten Zellen der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 unter Stickstoffatmosphäre, so erweisen sich die beiden Stämme als gleich stark und gleichartig beeinflussbar. Die Zellen waren für diese Versuche in YG-Vorkulturmedium gewachsen.

Vergleicht man die Inaktivierungskurven, die man für beide Diplonten nach zehnminütiger N₂-Vorbehandlung und ohne N₂-Behandlung erhält, so zeigt sich, daß beide Diplonten unter Stickstoffatmosphäre eine gleichgroße Dosisreduktion ²⁾ aufzeigen und damit der bekannte Sauerstoffeffekt bei Strahleninaktivierungen die Ausprägung des Resistenzeffektes nicht zu beeinflussen scheint.

$$\begin{aligned}
 1) \text{ DRW}_{211-1a/2} &= \frac{\text{LD}_{10} \text{ 211-1a/2 cysteingeschützt}}{\text{LD}_{10} \text{ 211-1a/2 nicht cysteingeschützt}} = \frac{64 \text{ krad}}{36,5 \text{ krad}} = 1,75 \\
 \text{DRW}_{211-1aM/2} &= \frac{\text{LD}_{10} \text{ 211-1aM/2 cysteingeschützt}}{\text{LD}_{10} \text{ 211-1aM/2 nicht cysteingeschützt}} = \frac{105 \text{ krad}}{60 \text{ krad}} = 1,75 \\
 2) \text{ DRW}_{211-1a/2} &= \frac{\text{LD}_{10} \text{ 211-1a/2 anaerob bestrahlt}}{\text{LD}_{10} \text{ 211-1a/2 aerob bestrahlt}} = \frac{54 \text{ krad}}{32 \text{ krad}} = 1,7 \\
 &\text{Mittelwert aus drei Versuchen:} \\
 \text{DRW}_{211-1aM/2} &= \frac{\text{LD}_{10} \text{ 211-1aM/2 anaerob bestrahlt}}{\text{LD}_{10} \text{ 211-1aM/2 aerob bestrahlt}} = \frac{96 \text{ krad}}{57 \text{ krad}} = 1,7
 \end{aligned}$$

³⁾ Siehe 2.4.5. Seite 28.

Die Bestrahlungsversuche mit Cystein-geschützten Zellen und die Bestrahlungsversuche unter anoxischen Bedingungen zeigten, daß mit diesen Mitteln keine unterschiedliche Beeinflussung der den Resistenzeffekt bewirkenden Mechanismen oder Reaktionen möglich zu sein scheint. Weitere Substanzen, deren Einfluß kurze Zeit vor der Bestrahlung beginnt, wurden nicht untersucht.

3.3.

UMWELTEINFLÜSSE NACH DER BESTRAHLUNG

In allen bisher beschriebenen Experimenten wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit durch Zählung der Überlebenden nach der Bestrahlung auf einem stets gleichartig hergestellten, genau definierten Medium bestimmt. Alle Messungen der Inaktivierungsrate und die daraus gewonnenen Werte basierten also auf Inaktivierungsexperimenten, die die Zahl der Überlebenden anhand des Kriteriums der Bildung einer mit dem bloßen Auge sichtbaren Kolonie auf mit Agar verfestigtem Vollmedium bestimmten.

Verändert man die Zusammensetzung des Nachkulturmediums, so variiert die Zahl der Zellen, die nach Bestrahlung eine makroskopisch sichtbare Kolonie bilden können (Überlebendenzahl), auch wenn die Zahl der unbestrahlten, koloniebildungsfähigen Zellen unverändert bleibt.

Darüber hinaus ist aber für die Überlebendenzahl nicht nur die Zusammensetzung des Nachkulturmediums von Bedeutung, sondern auch der Zeitpunkt, von dem ab die Zellen auf dem Nachkulturmedium wachsen können. Die Einflüsse von Komponenten des Mediums können durch qualitative und quantitative Veränderung des Angebots untersucht werden. Die Bedeutung, die der Zeitpunkt hat, von dem ab die Zellen auf oder in dem Nachkulturmedium wachsen können, kann man durch Veränderung der Zeitspanne zwischen Bestrahlungsende und Aufbringung (oder Einbringen) der Zellen auf (in) das Medium feststellen. In der dadurch entstehenden Zwischenzeit können die Zellen unterschiedlich behandelt werden. Sie können beispielsweise während dieser Zeit in der Bestrahlungssuspension verbleiben, oder, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben wird (siehe hierzu auch 2.4.6., postirradiative Verfahren, Seite 29), auf nährstofffreie oder nährstoffarme Zwischenbebrütungsmedien gebracht werden.

Wie die in den folgenden Abschnitten mitgeteilten Ergebnisse zeigen, ist sowohl die Zusammensetzung des Nachkulturmediums als auch der Zeitpunkt des Mediumangebots nach der Bestrahlung von Einfluß auf die Strahlenresistenz der diploiden Saccharomyces-Stämme.

3.3.1. Variation der Zusammensetzung des Nachkulturmediums

In allen bisher beschriebenen Versuchen wurde VM-Agar als Nachkulturmedium verwendet. In diesem Medium sind 1 % Hefeextrakt und 0,5 % tryptisch verdautes Pepton enthalten (siehe Rezept Seite 15).

Zur Untersuchung möglicher Einflüsse dieser beiden komplexen Mediumkomponenten auf die Überlebendenzahl nach einer Röntgenbestrahlung wurde nun versucht, diese beiden Mediumkomponenten durch eine Anzahl von Substanzen in bekannten Konzentrationen zu ersetzen. Das so entstandene synthetische Medium enthält 18 Aminosäuren, teils in L-Form, teils in DL-Form (bei Isoleucin in Form eines Gemisches aller Stereoisomeren, siehe Rezept Seite 18), die alle - bis auf Isoleucin und Valin für die IV-auxotrophen Stämme - für Wachstum und Vermehrung der untersuchten Stämme nicht unbedingt notwendig sind. Dieses Medium wurde SM + 18 AS genannt.

Läßt man einen Teil der Aminosäuren aus dem SM + 18 AS fort, so erhält man das auf Seite 17 beschriebene SM, das schon von den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Strahlenresistenz vom Vorkulturmedium bekannt ist.

Ausgehend von der in orientierenden Vorversuchen gemachten Beobachtung, daß die Zahl der bestrahlten koloniebildungsfähigen Zellen des auxotrophen Diplonten nach Vorkultur in YG auf SM-Agar, dem 0,5 % tryptisch verdautes Pepton zugesetzt worden war, bei gleicher Dosis deutlich größer ist als auf SM-Agar ohne Peptonzusatz, wurden Versuche unternommen, die hierfür verantwortliche(n) Komponente(n) des tryptisch verdauten Peptons zu identifizieren.

Da man annehmen kann, daß das tryptisch verdaute Pepton reich an Aminosäuren ist, kann man an erster Stelle vermuten, daß eine (oder mehrere) der in diesem Pepton enthaltenen Aminosäuren für den beobachteten Effekt verantwortlich oder mitverantwortlich sein könnte(n).

3.3.1.1. Überlebendenzahl auf SM-Agar + 18 Aminosäuren

Ein synthetisches Medium, dem eine Anzahl von Aminosäuren zugesetzt wurde und daher als erste Näherung an ein synthetisches Medium mit Zusatz von tryptisch verdaulichem Pepton angesehen werden kann, ist das SM + 18 AS.

Bringt man gleichgroße Mengen bestrahlter Zellen des Stammes 211-1aM/2, die in YG vorgezüchtet worden waren, auf VM-Agar und vergleichend hierzu auf SM-Agar + 18 AS, so zeigt sich, daß auf dem SM-Agar + 18 AS deutlich mehr Zellen des IV-auxotrophen Diplonten koloniebildungsfähig sind, als auf VM-Agar. So sind beispielsweise bei mit 60 krad bestrahlten Zellen auf VM-Agar etwa 10 %, auf SM-Agar + 18 AS aber noch etwa 30 % der Zellen koloniebildungsfähig.

Die Zahl der unbestrahlten koloniebildungsfähigen Kontrollzellen ist auf beiden Medien etwa gleichgroß. Abweichungen in den unbestrahlten Kontrollen gehen nicht über 10 % der Zahl der koloniebildungsfähigen Zellen auf VM-Agar hinaus.

Werden demgegenüber die Zellen des prototrophen Diplonten 211-1a/2 in gleicher Weise behandelt, so zeigen sie keinen "Resistenzgewinn" auf SM-Agar + 18 AS im Vergleich zu denen auf VM-Agar. Beispielsweise sind mit 60 krad bestrahlte Zellen auf VM-Agar noch zu 1 % und auf SM-Agar + 18 AS zu 1,3 % koloniebildungsfähig.

Abbildung 14 zeigt einen typischen Versuch für beide Stämme auf beiden Nachkulturmedien.

In SM + 18 AS, dessen pH dem des SM ohne Zusätze gleicht, teilen sich unbestrahlte Zellen des IV-auxotrophen Diplonten deutlich langsamer als unbestrahlte Zellen des prototrophen Diplonten. Sie teilen sich auch langsamer als in SM und als in VM. So beträgt die Zellzyklusdauer in der logarithmischen Wachstumsphase für den auxotrophen Diplonten in SM + 18 AS etwa 2,5 Stunden, während sie für den prototrophen 1,5 Stunden beträgt.

In den anderen erwähnten Medien beträgt die Zellzyklusdauer für den auxotrophen Stamm 1,2 bis etwa 1,5 Stunden.

Abbildung 15 zeigt einen typischen Wachstumsversuch für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 in VM und vergleichend dazu in SM + 18 AS (sowie in SM + 18 Aminosäuren in L-Form; siehe Seite 58). Die gleichgroßen Anfangstitern in den Wachstumsmedien wurden durch Beimpfen mit aliquoten Mengen aus der YG-Vorkultur erzielt. Deutlich erkennbar wächst der Stamm 211-1aM/2 in SM + 18 AS langsamer als in VM und auch langsamer als der Stamm 211-1a/2 in den beiden Medien.

Durch PATRICK u. HAYNES (1964) ist bekannt, daß Zellteilungsvorgänge Strahlenschaden-Reparaturprozesse behindern oder verhindern können. Sucht man nach einer Erklärung für die erhöhte Zahl der koloniebildungsfähigen bestrahlten Zellen des IV-auxotrophen Diplonten auf SM-Agar + 18 AS, so könnte man nun umgekehrt folgern, daß die mit diesem Medium beim Stamm 211-1aM/2 korrelierte Zellteilungsbehinderung (wie sie das Wachstum unbestrahlter Zellen erkennen läßt) hierfür verantwortlich ist. Da die Zellen sehr wahrscheinlich zusätzlich nach der Bestrahlung noch mehrere Stunden ohne Teilungsprozesse auf dem Medium liegen können, könnten während dieser Zeit Reparaturprozesse in den Zellen ablaufen.

Wie in Abbildung 15 weiterhin erkennbar ist, kann durch das Vorhandensein nur reiner L-Formen der Aminosäuren in dem mit 18 Aminosäuren angereicherten Medium das Wachstum unbestrahlter Zellen des IV-auxotrophen Stammes 211-1aM/2 auf eine Zellzyklusdauer von etwa 6 Stunden gedrosselt werden. In diesem SM + 18 L-AS genannten Medium weist der prototrophe Stamm 211-1a/2 - nach einer relativ langen lag-Zeit von etwa 3 Stunden - eine Zellzyklusdauer von etwa 1,5 Stunden auf, die also dieselbe ist wie in SM + 18 AS und etwa dieselbe wie in VM.

Obwohl, wie in Abbildung 15 erkennbar, das Wachstum unbestrahlter Zellen des Stammes 211-1aM/2 in SM + 18 L-AS gegenüber dem Wachstum in SM + 18 AS deutlich verlangsamt ist, stellt sich aber nach Röntgeninaktivierungsexperimenten keine größere Zahl koloniebildungsfähiger Zellen auf diesem Medium ein, als auf dem synthetischen Medium mit bestimmten Aminosäuren in DL-Form (Es wurden alle Aminosäuren, die in DL-Formen zugegeben waren, durch solche in reiner L-Form ersetzt; siehe hierzu das Rezept auf Seite 18).

In Abbildung 14 sind in den Kurvenverlauf der Dosiseffektkurve des Stammes 211-1aM/2 nach Vorkultur YG und Nachkultur auf SM-Agar + 18 AS die Werte für die Nachkultur auf SM-Agar + 18 L-AS eingetragen.

Im weiteren wurden Versuche mit synthetischen Medien unternommen, denen eine bestimmte Anzahl Aminosäuren zugesetzt wurden ¹⁾, die in der gewählten Kombination zu einer (etwa 6 Stunden) langen beziehungsweise (etwa 2 Stunden) kurzen Zellzyklusdauer bei den Zellen des Stammes 211-1aM/2 im entsprechenden Medium führten.

Wie aber Bestrahlungsexperimente zeigten, scheint eine mögliche Zellteilungsbehinderung in dem durch das eine verwendete Medium erzeugten Ausmaß nach Röntgenbestrahlung für das Ansteigen der Zahl der koloniebildungsfähigen bestrahlten Zellen bei dem Stamm 211-1aM/2 auf diesen Medien im Vergleich zu SM-Agar nicht verantwortlich zu sein. Die Röntgeninaktivierungskurven für den Stamm 211-1aM/2 nach Vorkultur YG und bei Nachkultur auf diesen drei Medien, denen Aminosäuren in verschiedenen Kombinationen zugesetzt worden waren, die die Zellzyklusdauer beeinflussen konnten, waren praktisch gleich.

¹⁾ Es wurden folgende Aminosäuren zugegeben (Mengen wie im Rezept Seite 18 angegeben):

1. SM + 11 AS (Zellzyklus- dauer: ~ 6 Std.)	2. SM + 13 AS (Zellzyklus- dauer: ~ 2 Std.)	3. SM + 11 AS (Zellzyklus- dauer: ~ 2 Std.)
L(+) Alanin	L(+) Alanin	L(+) Alanin
L(+)Cystein·HCl	L(+)Cystein·HCl	L(+)Cystein·HCl
L(+)Histidin- dihydrochlorid	L(+)Histidin- dihydrochlorid	L(+)Histidin- dihydrochlorid
DL-Isoleucin	DL-Isoleucin	DL-Isoleucin
DL-Methionin	DL-Methionin	DL-Methionin
DL-Tryptophan	DL-Tryptophan	DL-Tryptophan
<u>DL-Valin</u>	<u>DL-Valin</u>	<u>DL-Valin</u>
L(+)Arginin·HCl	L(+)Arginin·HCl	Glycocoll
L(-)Asparagin	L(-)Asparagin	L-Leucin
L(-)Cystin	L(-)Cystin	L(+)Lysin·HCl
L-Glutaminsäure	L-Glutaminsäure	L(-)Prolin
Glycocoll		
L-Leucin		

Weitere Versuche zur Identifizierung einer einzelnen Aminosäure oder weiterer Kombinationen von Aminosäuren, die die Zellzyklusdauer bei dem IV-auxotrophen Stamm 211-1aM/2 beeinflußt (beeinflussen), waren erfolglos. Es konnte auch nicht geklärt werden, welche Ursache(n) die Erhöhung der Zahl der koloniebildungsfähigen Zellen bei dem Stamm 211-1aM/2 nach Bestrahlung auf SM-Agar + 18 AS im Vergleich zu VM-Agar hat.

3.3.1.2. Überlebendenzahl auf SM-Agar ohne Isoleucin und Valin dem 1 mol/Liter KCl zugesetzt ist

Die Isoleucin- und Valinbedürftigkeit des auxotrophen Haplonten 211-1aM gehört zur Gruppe der "osmotisch heilbaren Mutationen" (HAWTHORNE u. FRIIS, 1964). Die bei normalen osmotischen Verhältnissen auf SM-Agar ohne Isoleucin und Valin IV-bedürftigen Zellen benötigen bei osmotischen Drucken, die beispielsweise durch 1 m KCl [p.a. (Merck)] pro Liter Medium erreicht werden, keine Isoleucin- und Valingaben mehr zum Wachstum. Sie sind phänotypisch zur Prototrophie revertiert ¹⁾.

Auch die Zellen des diploiden IV-auxotrophen Stammes 211-1aM/2 sind auf dem Isoleucin- und Valinfreien synthetischen Medium bei erhöhtem osmotischen Druck koloniebildungsfähig. Jedoch sind nur etwa 50 % der auf VM-Agar zu Kolonien aufwachsenden Zellen auf diesem SM-Agar + KCl -Ileu -Val genannten Medium koloniebildungsfähig. Da der Stamm 211-1aM/2 durch endomitotische Diploidisierung aus dem Haplonten 211-1aM hervorgegangen ist, die IV-Auxotrophie also bei beiden Stämmen auf Grund desselben Defektes vorhanden ist, erscheint es mit gutem Grund berechnigt, auch den Diplonten als Missens-Mutante zu interpretieren, wie es HAWTHORNE u. FRIIS für den Haplonten taten (siehe hierzu Seite 36).

Die Missens-Mutation bewirkt nach HAWTHORNE u. FRIIS, daß infolge einer Code-Änderung in der DNS in den Zellen ein "abnorm gefaltetes Protein als Folge einer einzelnen Aminosäuresubstitution" gebildet wird.

1) Abimpfungen phänotypisch zur Prototrophie revertierter Zellen erwiesen sich auf SM-Agar -Ileu -Val als IV-auxotroph.

Das würde hier, bei den IV-auxotrophen Zellen, vermutlich ein für die IV-Synthese wichtiges Protein (beispielsweise für ein Enzym in der Synthesekette) sein. Bei Wachstum der Zellen unter erhöhtem osmotischen Druck wäre dieses Enzymprotein dann nicht mehr abnorm gefaltet, und bei den genotypisch IV-auxotrophen Zellen würde eine "Phänokopie" der Prototrophie vorliegen.

Werden die Zellen des auxotrophen Diplonten 211-1aM/2 nach einer Röntgenbestrahlung auf SM-Agar + 1 m KCl -Ileu -Val gebracht, so könnten sie, da sie auf dem Nachkulturmedium phänotypisch zur Prototrophie revertiert sind, auf diesem Medium eine Überlebensrate aufweisen, die der von Zellen des genotypisch prototrophen Diplonten 211-1a/2 entspricht. Insbesondere bei Anzucht in Vorkulturmedien, nach denen zwischen den genannten Stämmen bei gleicher Bestrahlungsdosis deutlich unterschiedliche Inaktivierungsraten (bei VM-Agar als Nachkulturmedium) auftreten, sollten dann die Dosiseffektkurven für die beiden Diplonten trotzdem, bei SM-Agar + 1 m KCl -Ileu -Val als Nachkulturmedium, gleich sein. Die Inaktivierungspunkte sollten also für beide Stämme bei jeweils gleicher Dosis dann auf einer Dosiseffektkurve liegen.

Werden nun die Zellen des auxotrophen Diplonten in flüssigem YG vorkultiviert, bestrahlt und dann nach der Bestrahlung auf ein Isoleucin- und Valin-freies SM gebracht, dem zur Erhöhung des osmotischen Drucks 1 m KCl/Liter Medium zugesetzt wurde, so besitzen sie eine Überlebenswahrscheinlichkeit auf diesem Medium, die etwa der auf VM-Agar entspricht ¹). Ihre Strahlenresistenz entspricht also nicht derjenigen der Zellen des Stammes 211-1a/2 nach gleicher Vorkultur. Nach Anzucht in YG-Vorkulturmedium sind die Zellen des IV-auxotrophen Stammes also auch auf diesem Medium deutlich strahlenresistenter als die des prototrophen Stammes.

¹) Die Überlebensrate ist bezogen auf die unbestrahlten koloniebildungsfähigen Kontrollzellen auf dem gleichen Medium. Da die Zahl der koloniebildungsfähigen unbestrahlten Zellen des Stammes 211-1aM/2 auf SM-Agar + 1 m KCl -Ileu -Val nur etwa 50 % von der Zahl der auf VM-Agar zu Kolonien aufgewachsenen Zellen beträgt, erscheint es nicht unproblematisch, die Inaktivierungsraten bei dem Stamm 211-1aM/2 auf diesen beiden Medien miteinander zu vergleichen.

Abbildung 16 zeigt die Inaktivierungskurven der diploiden Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach YG-Vorkultur bei Aufwachsen auf SM-Agar + 1 m KCl -Ileu -Val und auf VM-Agar.

Eine Reversion zur phänotypischen Prototrophie, wie sie auf SM-Agar + 1 m KCl -Ileu -Val möglich ist, vermag also, wie diese Ergebnisse aufzeigen, nach einer Röntgenbestrahlung die von dem Vorkulturmedium YG bestimmte Überlebenswahrscheinlichkeit nicht mehr wesentlich zu beeinflussen.

Wie Abbildung 16 erkennen läßt, scheint aber bei dem Stamm 211-1aM/2 eine gewisse Tendenz zu einer geringeren Inaktivierungsrate auf SM-Agar + 1 m KCl -Ileu -Val gegenüber VM zu bestehen¹⁾. Wie die folgenden Ergebnisse zeigen werden, können die Zellen des Stammes 211-1aM/2 aber beträchtlich weniger koloniebildungsfähig sein, wenn sie anstelle auf VM-Agar nach einer Bestrahlung auf SM-Agar ohne Zusätze gebracht werden.

3.3.1.3. Überlebendenzahl auf SM-Agar

Werden die Zellen des auxotrophen und des prototrophen Diplonten 211-1aM/2 und 211-1a/2 auf die bekannte Weise in YG vorgezüchtet und nach der Bestrahlung auf VM-Agar und zum Vergleich auf SM-Agar ohne Zusätze gebracht, so wachsen auf dem synthetischen Medium deutlich weniger Zellen des Stammes 211-1aM/2 zu einer Kolonie heran, als Zellen auf dem Vollmedium. Vergleicht man die Überlebendenzahl des auxotrophen mit der des prototrophen Diplonten, so zeigt sich, daß dieser Effekt auf den auxotrophen beschränkt ist. Demgegenüber sind beim prototrophen Diplonten auf SM-Agar bei gleicher Dosis mehr bestrahlte Zellen koloniebildungsfähig, als auf VM-Agar, während die Anzahl der unbestrahlten koloniebildungsfähigen Kontrollzellen auf SM-Agar und VM-Agar voneinander höchstens um 10 % abweicht.

¹⁾ Die Überlebensrate bezieht sich auf die auf SM-Agar + 1 m KCl -Ileu -Val zu Kolonien aufwachsenden Kontrollzellen, also auf etwa 50 % der auf VM-Agar zu Kolonien aufwachsenden Zellen.

Abbildung 17 zeigt einen typischen Versuch mit beiden Diplonten auf beiden Nachkulturmedien.

Ein Vollmedium und dieses synthetische Medium unterscheiden sich besonders in dem Gehalt an solchen Komponenten, die in dem im Vollmedium enthaltenen Hefeextrakt und in dem tryptisch verdauten Pepton vorhanden sind (siehe hierzu auch die Ausführungen auf den Seiten 48/49). Zweitens unterscheiden sie sich in dem pH-Wert, der in nicht mit Agar verfestigten Medien gemessen wurde.

Wie sich zeigte, ist der Gehalt an Mediumkomponenten, wie an den Versuchen mit SM-Agar + 18 AS erkennbar, für die Empfindlichkeitsverhältnisse von Bedeutung. Aber auch der pH-Wert ist für die Empfindlichkeitsverhältnisse von Einfluß. Es ist daher möglich, daß der unterschiedliche pH zwischen SM und VM für die in Abbildung 17 erkennbaren Empfindlichkeitsunterschiede verantwortlich oder mitverantwortlich ist.

In Abbildung 18 ist der Verlauf der Inaktivierungskurven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 dargestellt, die einerseits auf VM-Agar mit dem natürlichen pH von 6,5 und andererseits auf VM-Agar mit einem SM-simulierten pH von 3,7 nachkultiviert wurden. Deutlich erkennbar verhalten sich auf dem Medium, das bis zum pH des SM mit n-HCl angesäuert wurde, die beiden Diplonten ähnlich wie auf dem synthetischen Medium ohne Zusätze, das heißt der prototrophe Diplont ist etwas resistenter, während der auxotrophe Diplont empfindlicher ist als auf VM-Agar.

Zusammenfassend kann man, was die Einflüsse der Zusammensetzung des Nachkulturmediums auf die Überlebensrate nach einer Röntgenbestrahlung bei den beiden Diplonten betrifft, folgendes feststellen:

Die Zahl der koloniebildungsfähigen bestrahlten Zellen der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 hängt von der Zusammensetzung des Nachkulturmediums ab.

Die Zugabe einer Anzahl von Aminosäuren zu einem synthetischen Medium bewirkt einen Anstieg der Zahl der zu Kolonien aufwachsenden bestrahlten Zellen bei dem IV-auxotrophen Diplonten 211-1aM/2. Die Zahl der

Zellen steigt beispielsweise auf dem mit 18 Aminosäuren angereicherten Medium bei einer Bestrahlung von 60 krad von 10 % auf 30 % der unbestrahlten Zellen des gleichen Mediums an. Die für diesen Anstieg verantwortliche(n) Aminosäure(n) konnte(n) nicht identifiziert werden.

Eine mit der Anwesenheit der 18 Aminosäuren im Medium verbundene (von etwa 2 Stunden auf etwa 6 Stunden Zellzyklusdauer) herabgesetzte Zellteilungsgeschwindigkeit bei dem Stamm 211-1aM/2 scheint für den Anstieg der Zahl der Koloniebildungsfähigen nach Bestrahlung bei diesem Stamm nicht verantwortlich zu sein. Es konnte nicht geklärt werden, welche Ursachen für den Anstieg der Zahl der eine Bestrahlung überlebenden Zellen auf diesem Medium bei dem IV-auxotrophen Diplonten verantwortlich sind.

Die Zellen des IV-auxotrophen Diplonten 211-1aM/2 sind, analog zu aus der Literatur bekannten Ergebnissen bei dem IV-auxotrophen Haplonten 211-1aM, von dem sich der Diplont ableitet, auf einem IV-freien synthetischen Medium bei erhöhtem osmotischen Druck (jedoch nur zu etwa 50 %) koloniebildungsfähig.

Der Röntgenresistenzgewinn, wie er sich bei dem IV-auxotrophen Diplonten gegenüber dem prototrophen Diplonten nach Vorkultur in YG einstellt, bleibt bei dem auxotrophen Diplonten auf dem IV-freien SM-Agar als Nachkulturmedium im wesentlichen erhalten. Die Zahl der Überlebenden beträgt beispielsweise bei einer Bestrahlungsdosis von 60 krad 5 % auf diesem Medium gegenüber etwa 10 % auf VM-Agar, bezogen auf die unbestrahlten koloniebildungsfähigen Zellen auf demselben Medium, während bei derselben Vorkultur die Zahl der Überlebenden des prototrophen Diplonten auf beiden Medien bis auf etwa 1 % der Kontrollwerte zurückgegangen ist. Die unbestrahlten Zellen des prototrophen Diplonten besitzen auf dem Medium mit erhöhtem osmotischen Druck nach Vorkultur YG fast unverändert die gleiche Koloniebildungsfähigkeit wie auf VM-Agar.

Versuche, bei denen die in YG vorkultivierten Zellen der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach der Bestrahlung auf VM-Agar mit verschiedenen, durch Ansäuern mit n-HCl erzielten pH-Werten aufwuchsen,

zeigten, daß der pH-Wert des Nachkulturmediums unter bestimmten, nicht näher erkannten Umständen zu einer Verminderung der Überlebenden bei dem IV-auxotrophen Diplonten führen kann. Diese Ergebnisse erinnern an Befunde von PATRICK u. HAYNES (1964), die bei Untersuchungen zur Recovery durch langfristige Aufbewahrung ohne Nährstoffe (siehe auch Seite 8) bei röntgenbestrahlten Zellen von Saccharomyces cerevisiae fanden, daß diese Reparaturprozesse pH-abhängig sind. Sie fanden, daß zunehmende Azidität des Aufbewahrungsmediums die Recovery zunehmend verhindert.

Obwohl auch der SM-Agar + 1 m KCl -Ileu -Val und der SM-Agar + 18 AS etwa gleich sauer waren, wie der SM-Agar ohne Zusätze, waren nach gleicher Dosis auf diesen Medien deutlich mehr Zellen koloniebildungsfähig.

3.3.2. Untersuchung der Recovery-Aktivität

Zur Überprüfung der Frage, wie der mit einer IV-Bedürftigkeit gekoppelte, unter bestimmten Vor- und Nachkulturbedingungen sich einstellende Resistenzgewinn bei dem Diplonten sich zur Recovery verhält, wurden Versuche mit Zwischenbebrütungen auf nährstofffreien oder nährstoffarmen Medien unternommen.

Werden die Suspensionen bestrahlter höherploidier Saccharomyces-Zellen für ein bis vier Tage bei Bebrütungstemperatur im Dunkeln aufbewahrt, ohne daß sie Nährstoffe enthalten, so steigt die Zahl der koloniebildungsfähigen Zellen in den Suspensionen stark an (Recovery; vergleiche KOROGODIN, 1958; PATRICK, HAYNES u. URETZ, 1964; PATRICK u. HAYNES, 1964). Bei Haplonten kann Recovery nicht beobachtet werden. In der Zellsuspension, in der ja auch - besonders in der mit hohen Dosen bestrahlten Suspension - nicht koloniebildungsfähige und geplatzte Zellen suspendiert sind, die sich im Verlauf der Zwischenbebrütungszeit in der Suspensionsflüssigkeit auflösen könnten, könnte sich durch diese Zellen eine schwache Konzentration an gelöstem "Hefeextrakt" bilden.

Es ist denkbar, daß die wässrige Lösung des auf diese Weise entstandenen "Hefeextraktes" Vermehrungsprozesse auf dem Glucose-Agar gestattet. Um diesen theoretisch möglichen Einfluß dieses "Hefeextraktes" weitgehend auszuschalten, kann man die Saccharomyces-Zellen während der Aufbewahrungszeit festlegen und von den lysierten Zellen möglichst isolieren. Ein zu diesem Zweck entwickeltes Verfahren wurde Zellfixier-Technik genannt (siehe Seite 29).

Im Unterschied zu PATRICK et al. wird hier den Zellen während der Aufbewahrungszeit Glucose geboten, so daß die Zellen sicherlich atmen, sich aber nicht teilen können. Das Anbieten von Glucose während der Zwischenbebrütungszeit soll mögliche Recovery-Prozesse unterstützen. Vergleichende Zwischenbebrütungen auf reinem Agar und auf mit 2 % Glucose angereichertem Agar ergaben nämlich, daß bei gleicher Bestrahlungsdosis auf dem Glucose-Agar durch die Recovery eine größere Zahl von koloniebildungsfähigen Zellen ermöglicht wurde als auf dem reinen Agar.

Verhindert man nach der Röntgenbestrahlung für 48 Stunden durch Anwendung der Zellfixier-Technik bei den Stämmen 211-1a/2 und 211-1aM/2 die Zellteilungsprozesse, so kann man einen starken Zuwachs an Überlebenden für beide Stämme erreichen. Die Zahl der koloniebildungsfähigen Zellen kann - besonders bei stark bestrahlten Zellen - nach Anwendung der Zellfixier-Technik und nach bestimmten Vorkulturen um das Zehn- bis mehr als Zwanzigfache steigen. So beträgt beispielsweise nach YG-Vorkultur die Zahl der überlebenden Zellen bei dem Stamm 211-1a/2 bei 60 krad (wenn diese unmittelbar nach der Bestrahlung auf VM-Agar gebracht werden) 0,6 %, nach Anwendung der Zellfixier-Technik für 48 Stunden aber 21 % der Zahl der unbestrahlten Kontrollzellen.

Wählt man nun die Vorkulturbedingungen so, daß sich nach Röntgenbestrahlung - wenn die bestrahlten Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung auf VM-Agar gebracht werden - der mit der IV-Bedürftigkeit verbundene Resistenzeffekt einstellt, so erhält man nach Anwendung der Zellfixier-Technik für beide Diplonten Recovery-Dosiseffektkurven, deren Streubereiche ineinandergehen.

In Abbildung 19 kann man sehen, daß 48 Stunden nach der Bestrahlung die Überlebendenprozentzahl des prototrophen Diplonten derart stark angestiegen ist, daß sie bei gleicher Dosis der ebenfalls noch deutlich angestiegenen Überlebendenprozentzahl des auxotrophen Diplonten gleich wird.

Bewirkt man dagegen durch die Vorkulturbedingungen, daß zunächst die Zahl der überlebenden Zellen bei sofortigem Aufbringen der Zellen auf VM-Agar für beide Diplonten etwa gleich ist, der DRW also etwa = 1 ist so kann man keine einheitliche Recovery-Dosiseffektkurve mehr erzielen. Vielmehr ist die Zahl der überlebenden Zellen nach 48 Stunden Zellteilungsruhe dann so angestiegen, daß die Recovery-Dosiseffektkurve des auxotrophen und des prototrophen Diplonten deutlich verschieden verlaufen. Abbildung 20 zeigt, daß die geringsten Inaktivierungsraten dann bei dem prototrophen Diplonten beobachtet werden können.

Wird der Resistenzeffekt durch die Wahl des Vorkulturmediums aufgehoben, und der IV-bedürftige Diplont ist ebenso strahlenempfindlich wie der prototrophe Vergleichsstamm, so kann der dadurch bedingte Verlust an Überlebenden durch die Recovery nicht wieder behoben werden. Ist andererseits der Resistenzeffekt infolge des Vorkulturmediums ausgeprägt, der IV-bedürftige Diplont also bei gleicher Dosis resistenter als der prototrophe Vergleichsstamm, so kann auch die Recovery noch zusätzlich ablaufen. Die Recovery ermöglicht mithin einen zu dem (mit der IV-Bedürftigkeit verbundenen) Resistenzgewinn zusätzlichen Gewinn an Überlebenden.

Nach Vorkultur in YG setzt sich also bei dem auxotrophen Diplonten die in Abbildung 19 erkennbare hohe Überlebensrate aus zwei Anteilen zusammen:

1. dem Anteil, der durch die Vorkultur in Kombination mit der verwendeten Nachkultur ermöglicht wurde,
2. dem Anteil, der durch die Zellfixier-Technik und die verwendete Nachkultur ermöglicht wurde.

Bei dem prototrophen Diplonten wird die hohe Überlebensrate dagegen nur von der Recovery bewirkt.

Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, daß in den Zellen des Stammes 211-1aM/2 nach Vorkultur in YG Reparaturprozesse möglich sind, die unmittelbar nach der Bestrahlung ablaufen und welche den enzymatisch gesteuerten, während längerer Zellteilungshemmung auftretenden Recovery-Prozessen ähnlich sind. Zwar ist, wie man in Abbildung 19 erkennt, der auxotrophe Diplont nach Vorkultur in YG in der Lage, einen gleichen maximalen Recovery-Wert an Überlebenden zu erreichen wie der prototrophe. Jedoch ist die "Fähigkeit" zur Recovery dieses Stammes geringer. Wie in Tabelle 2 anhand der Dosisreduktionswerte fest-

Vorkultur	Stamm	LD ₁₀ nach Recovery	LD ₁₀ vor Recovery	D R W
		in krad	in krad	
YG	211-1aM/2	90 "	56 "	1,60
YG	211-1a/2	90 "	30 "	3,00
VM	211-1aM/2	64 "	42 "	1,52
VM	211-1a/2	90 "	42 "	2,14

Tabelle 2.

$$\text{LD}_{10} \text{ und Dosisreduktionswerte, gebildet aus } \text{DRW} = \frac{\text{LD}_{10} \text{ nach Recovery}}{\text{LD}_{10} \text{ vor Recovery}},$$

für die diploiden Saccharomyces-Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 in Abhängigkeit von der Vorkultur der Zellen.

gestellt werden kann, beträgt die durch die Recovery erreichbare Dosisreduktion (verstanden als postirradiative Reduktion der Auswirkung von durch Strahlen gesetzten Schäden) nur etwa die Hälfte der bei dem prototrophen Diplonten möglichen Reduktion.

Wie man in Abbildung 20 erkennt, ist die Recovery-Aktivität bei dem Stamm 211-1aM/2 nach Vorkultur in VM, nach der der durch eine Vorkultur erzielbare mit der IV-Bedürftigkeit verbundene Resistenzgewinn nicht auftritt, etwa gleichgroß wie nach Vorkultur in YG. Die durch

die Recovery mögliche Dosisreduktion ist nach beiden Vorkulturen, wie auch Tabelle 2 erkennen läßt, bei dem Stamm 211-1aM/2 etwa gleich groß. Sowohl nach Anzucht in YG (hier Stamm 211-1aM/2 resistenter als Stamm 211-1a/2) als auch nach Anzucht in VM (hier Stamm 211-1aM/2 etwa gleich strahlenempfindlich wie Stamm 211-1a/2) kann also durch die Recovery eine etwa gleichgroße Quote an weiteren Überlebenden bei dem Stamm 211-1aM/2 hinzugewonnen werden.

Bei dem Stamm 211-1a/2 wird dagegen unabhängig von der Vorkultur ein maximaler Recovery-Wert an Überlebenden erreicht. Die LD_{10} für den Stamm 211-1a/2 nach Recovery ist bei beiden Vorkulturen etwa gleich (siehe Tabelle 2).

Um festzustellen, ob sowohl nach Vorkulturen, die den Resistenzeffekt bewirken, als auch nach Vorkulturen, nach denen sich der Resistenzeffekt nicht einstellt, die maximal erreichbare Recovery-Quote innerhalb von 48 Stunden bei beiden Diplonten erreicht wird, ist die Zeitabhängigkeit der Recovery-Prozesse bei den Stämmen 211-1a/2 und 211-1aM/2 überprüft worden.

Wendet man vor Ermöglichung der Vermehrungsprozesse nach einer Bestrahlung die Zellfixier-Technik zur Recovery für unterschiedlich lange Zeiten an, so zeigt sich, daß die zur maximalen Recovery erforderliche Zeit von der Dosis, mit der die Saccharomyces-Zellen bestrahlt wurden, abhängt. Die zur maximalen Recovery erforderliche Zeit wird länger bei steigender Dosis. Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen von PATRICK u. HAINES (1964) überein, die an Saccharomyces-Zellen, welche in destilliertem Wasser bei 30°C im Dunkeln zwischenbebrütet wurden, gewonnen worden waren.

Bei den Versuchen zur Abhängigkeit der Recovery von der Zeit der Anwendung der Zellfixier-Technik zeigte sich weiterhin, daß die maximale Recovery bei den angewendeten Dosen innerhalb von 48 Stunden erreicht wird.

Wie Abbildung 21 zeigt, erreichen der auxotrophe und der prototrophe Stamm nach einer Vorkultur, die den Resistenzeffekt erzeugt ($DRW > 1$), bei einer Dosis von 40 krad nach etwa 24 Stunden und bei einer Dosis von 80 krad nach etwa 32 Stunden den Maximalwert.

Auch nach einer Vorkultur, die den Resistenzeffekt aufhebt ($DRW = 1$), wird, wie Abbildung 22 zeigt, bei den angewendeten Dosen innerhalb von 48 Stunden die maximale Recovery erreicht. Die zum Erreichen des Maximalwertes erforderliche Zeit beträgt unter diesen Bedingungen beispielsweise bei einer Dosis von 40 krad etwa 24 Stunden und bei 80 krad etwa 30 Stunden.

Bei den untersuchten Saccharomyces-Stämmen läßt sich keine klare Abhängigkeit der nach gleicher Dosis zur maximalen Recovery erforderlichen Zeit von der Vorkultur feststellen. Es deutet sich jedoch an, daß der Maximalwert insbesondere nach höheren Bestrahlungsdosen nach Vorkultur der Zellen in YG später erreicht wird als nach Vorkultur in VM (siehe hierzu Abbildung 21 in Verbindung mit Abbildung 22). Besonders bei dem auxotrophen Diplonten 211-1aM/2, der nach Vorkultur in YG nach gleicher Dosis ohne Recovery schon eine relativ hohe Überlebensrate gegenüber dem prototrophen Diplonten 211-1a/2 aufweist, deutet sich an, daß die Recovery-Prozesse unter diesen Bedingungen zum maximalen Erreichen des weiteren Anteils an Überlebenden längere Zeit erfordern, als nach Vorkultur in VM.

Der (zweite) Anteil an der in Abbildung 19 erkennbaren hohen Überlebensrate bei dem auxotrophen Diplonten, der auf den mit der IV-Bedürftigkeit gekoppelten Resistenzgewinn gewissermaßen aufgestockt werden kann, wird also durch Recovery-Prozesse gewonnen, die verzögert abzulaufen scheinen im Vergleich zu denen bei Vorkultur der Zellen in VM.

4.

D I S K U S S I O N

In den Hefezellen treten infolge der Röntgeneinstrahlung Veränderungen auf, die auf die Wechselwirkung zwischen der eingestrahlten Energie und der Materie zurückgehen. So können beispielsweise Ionen und Radikale infolge von Verschiebungen der chemischen Ladungsverhältnisse an den Molekülen in dem Organismus entstehen. Die primären Ereignisse an den Molekülen des Organismus sagen aber noch nicht viel über die mögliche biologische Wirkung der Veränderungen aus.

Während die Wechselwirkung zwischen der eingestrahlten Energie und der Materie primär sicherlich stets gleich ist, ist es möglich, die biologische Ausprägung der Strahlenwirkung unterschiedlich zu beeinflussen. Grundsätzlich kann die biologische Wirkung der Röntgenstrahlen auf zweierlei Weise beeinflusst werden. Die erste Beeinflussungsmöglichkeit besteht in einer Verhinderung der Schädigung der Makromoleküle in der Zelle, die zweite in einer Rückgängigmachung der Schädigung. Während es also in dem einen Fall zu keinem Defekt an den Makromolekülen kommt, weil beispielsweise bestimmte Substanzen in der Zelle als "Radikalfänger" wirken (vergleiche beispielsweise ELDJARN u. PIHL, 1961), werden in dem anderen Fall bereits fixierte Schäden wieder behoben. In dem einen Fall wird also ein Strahlenschutz ausgeübt, in dem anderen Fall werden bereits induzierte Strahlenschäden wieder repariert.

Eine Schutzwirkung kann daher im wesentlichen nur von einer Substanz ausgeübt werden, die während der Bestrahlung in der Zelle anwesend ist. Eine Schutzwirkung, die erst nach dem Ende der Bestrahlung beginnt, ist nicht (oder im wesentlichen nicht) möglich, da die durch die Röntgenbestrahlung (insbesondere bei den hier angewandten Dosen und der eingestellten Dosisleistung) erzeugten Ionen und Radikale (siehe Seite 7) im wesentlichen sehr kurzlebiger Natur sind und nach der Beendigung der Bestrahlung nicht mehr (oder mit den hier angewandten Methoden nicht mehr) beeinflusst oder erfaßt werden können.

Für das Auftreten der relativen Röntgenstrahlenresistenz bei dem IV-auxotrophen Diplonten 211-1aM/2 gegenüber dem prototrophen Diplonten 211-1a/2 hatte LASKOWSKI (1962a; 1962c) als Erklärungsmöglichkeit angeführt, daß sich in den Zellen, deren Fähigkeit zur Synthese der Aminosäuren ¹⁾ blockiert ist, Vorstufen ansammeln, die eine Strahlenschutzwirkung ausüben. Zusätzlich hierzu erwies sich die Schutzwirkung als ploidiegradabhängig, denn die relative Röntgenstrahlenresistenz trat nur bei höherploiden Zellen in Erscheinung.

Da die Inaktivierung von haploiden Zellen bei Saccharomyces vorwiegend auf induzierten rezessiven Letalmutationen beruht, die Inaktivierung höherploider Zellen aber vorwiegend auf induzierten dominanten Letalmutationen (vergleiche beispielsweise STEIN u. LASKOWSKI, 1960), schien eine Erklärung der Ploidiegradabhängigkeit der Schutzwirkung nicht unmöglich. Diese Schutzwirkung wäre möglich, wenn man annimmt (vergleiche LASKOWSKI, 1962c), daß durch die sich ansammelnden Zwischenprodukte aus der Aminosäure-Synthesekette besonders die Induktionswahrscheinlichkeit dominanter Letalmutationen erniedrigt wird.

Im Lichte der vorliegenden Ergebnisse wird die Deutung des Resistenzgewinns bei dem IV-auxotrophen Stamm 211-1aM/2 nach bestimmten Vorkulturen als Ergebnis eines S t r a h l e n s c h u t z e s durch angesammelte Produkte in den Zellen nunmehr unwahrscheinlich. Bei dem IV-auxotrophen Stamm 211-1aM/2 ist nämlich, wie die Ergebnisse der Untersuchungen zur Variation der Zusammensetzung des Nachkulturmediums zeigten, der durch die Vorkultur erreichbare Resistenzgewinn noch nach der Bestrahlung modifizierbar. Der Resistenzgewinn kann einerseits vergrößert werden, wie Untersuchungen zur Recovery-Aktivität (siehe 3.3.2., Seite 64) und mit angereichertem synthetischen Medium (siehe 3.3.1.1., Seite 56) zeigten, und er kann andererseits verringert und nahezu aufgehoben werden, wie Untersuchungen mit synthetischem Medium ohne Zusätze und mit stark angesäuertem Vollmedium zeigten (vergleiche 3.3.1.3., Seite 61).

¹⁾ Die von LASKOWSKI aufgestellte Hypothese betrifft auch einen Serinbedürftigen Diplonten, Stamm 211-1bN/2, sowie alle vom Stamm 211-1aM abgeleiteten IV-auxotrophen höherploiden Stämme und alle vom entsprechenden Serin-bedürftigen Haplonten abgeleiteten höherploiden Stämme.

Eine zusätzliche postirradiative Erhöhung der Überlebensrate durch die bekannten Recovery-Prozesse ist auch bei einem durch die Vorkulturbedingungen erzielten Resistenzgewinn noch möglich. Dies ist mit der von LASKOWSKI aufgestellten Hypothese, daß der Resistenzgewinn durch Strahlenschutzvorgänge ¹⁾ infolge der Anwesenheit einer Schutzsubstanz während der Bestrahlung möglich sein kann, vereinbar. Hingegen ist eine postirradiative Aufhebung eines durch die angenommenen Strahlenschutzvorgänge erreichten Resistenzgewinns (wie beispielsweise bei Nachkultur auf angesäuertem Vollmedium beobachtet) nur schwer verständlich und mit der aufgestellten Hypothese nur schlecht vereinbar. Hierzu müßte dann angenommen werden, daß die durch das besondere intrazelluläre Milieu strahlengeschützt gewesenen Zellen des IV-auxotrophen Diplonten Strahlenschäden erlitten hatten, die einmal auf dem einen Nachkulturmedium manifest werden und ein andermal auf dem anderen Nachkulturmedium nicht manifest werden.

Im anderen Falle, in dem man annimmt, daß die durch den Einfluß der Strahlenschutzsubstanz erhalten gebliebene unbegrenzte Zellteilungsfähigkeit bei den gleichen Zellen auch wirklich erhalten bleibt, müßte man als Hilfshypothese annehmen, daß ein Teil der bestrahlten Zellen auf dem stark sauren Medium seine Koloniebildungsfähigkeit einbüßt und dadurch eine Aufhebung des durch Strahlenschutzvorgänge bewirkten Resistenzgewinns vortäuscht.

Ein Vergleich der Zahl unbestrahlter Kontrollzellen auf VM-Agar, auf stark angesäuertem VM-Agar und auf SM-Agar zeigt aber, daß die Koloniebildungsfähigkeit bei den Stämmen 211-1a/2 und 211-1aM/2 auf SM-Agar und VM-Agar bei pH = 3,7 noch nicht merklich geschädigt ist, so daß die obige Hilfshypothese nicht gerechtfertigt erscheint.

Die Ergebnisse der Experimente mit bestrahlten Zellen des IV-bedürftigen Diplonten 211-1aM/2, von denen die nach einer bestimmten Vorkultur auf VM-Agar aufgewachsenen Proben den Resistenzeffekt aufwiesen, auf

¹⁾ Über Strahlenschutzmechanismen und -prozesse siehe beispielsweise ELDJARN u. PIHL (1961).

SM-Agar und angesäuertem VM-Agar hingegen nicht (siehe 3.3.1.3., Seite 61 und Abbildungen 17 und 18), gestatten vielmehr die Deutung, daß in den Zellen des Stammes 211-1aM/2 nach der Beendigung der Bestrahlung Prozesse ablaufen können, die zu einer im Vergleich zum Stamm 211-1a/2 erhöhten Überlebensrate führen.

Neben diesen Ergebnissen sind es besonders die Untersuchungsergebnisse von HAWTHORNE u. FRIIS (1964), die die Deutung des bei dem IV-auxotrophen Diplonten nach bestimmten Vorkulturbedingungen erreichbaren Resistenzgewinns als einer *p o s t i r r a d i a t i v e n* *R e p a r a t u r* nahe legen.

Durch die Untersuchungen von HAWTHORNE u. FRIIS, in die der IV-bedürftige haploide Stamm 211-1aM einbezogen war, ergab sich, daß diese Spontanmutante zur Isoleucin- und Valin-Bedürftigkeit als eine relativ seltene Missens-Mutante anzusehen sei ¹⁾. Auf Grund der hierzu ergänzend durchgeführten Untersuchungen (vergleiche 3.3.1.2., Seite 59) und der Entstehung durch endomitotische Diploidisierung ist es klar, daß der diploide Stamm 211-1aM/2 eine Mutante gleichen Typs wie der Haplont ist. Es ist daher zulässig, auch den IV-auxotrophen, homozygoten diploiden Stamm 211-1aM/2 als Missens-Mutante zu bezeichnen.

Die Ergebnisse von HAWTHORNE u. FRIIS lassen für den IV-auxotrophen Haplonten 211-1aM und damit auch für den IV-auxotrophen Diplonten 211-1aM/2 die Erklärung zu, daß die Bedürftigkeit infolge der Änderung eines Codons in der DNS und dem daraus resultierenden Einbau einer falschen Aminosäure in eine Polypeptidkette zustande kommt. Durch den Einbau der falschen Aminosäure erhält das entstehende Polypeptid eine falsche Aminosäuresequenz. Die infolge der Aminosäuresubstitution falsche Aminosäuresequenz führt zu einer abnormen Faltung des aus dem Polypeptid entstehenden Proteins. Bei der IV-bedürftigen Mutante könnte dieses abnorm bzw. (in bezug auf den alten Zustand) falsch gefaltete Protein ein Protein sein, das in der intakten ungestörten Synthesekette von Isoleucin und Valin als Enzym notwendig wäre. Am wahrscheinlichsten ist die Annahme, daß das ursprüngliche Protein zu einem

¹⁾ Unter den 30 untersuchten IV-bedürftigen Mutanten von Saccharomyces fanden sich neben der Mutante 211-1aM nur noch zwei weitere Mutanten, die die gleichen Kriterien, die als Eigenschaften von Missens-Mutanten gedeutet wurden, aufwiesen.

Enzym (oder Apoenzym davon) gehört, das an der Synthese von Isoleucin und Valin oder deren Vorläufern beteiligt ist ¹⁾). Durch die Veränderung in der Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden Veränderung der Sekundär- und/oder Tertiärstruktur des betroffenen Proteins ist dieses nun derart verändert, daß es für die Synthese von Isoleucin und Valin oder deren Vorläufern unbrauchbar ist. Es könnte nun infolge der veränderten Aminosäuresequenz und der damit veränderten Faltung des Proteins bei diesem Enzym (oder Apoenzym davon) die Substratspezifität verändert sein und das Enzym könnte nun in der Lage sein, Strahlenschäden zu reparieren. Als Indiz hierfür kann die relativ hohe Strahlen-"Resistenz" des Stammes 211-1aM/2 auf SM-Agar + 1 m KCl - Ileu - Val angesehen werden, die etwa der auf VM-Agar nach gleicher Vorkultur entspricht (siehe 3.3.1.2., Seite 59 und Abbildung 16). Die auf Seite 59 und folgende beschriebenen Ergebnisse können nun dahingehend gedeutet werden, daß die Zellen des Stammes 211-1aM/2 nach der Vorkultur YG eine so große Zahl von Molekülen des zur IV-Synthese unbrauchbaren Enzyms mit veränderter Substratspezifität angesammelt haben, daß sie eine Überlebensrate zeigen, wie sie sich auch auf VM-Agar als Nachkulturmedium einstellt.

In den Zellen des Stammes 211-1aM/2 können andererseits bei Wachstum auf diesem synthetischen Medium Isoleucin und Valin gebildet werden. Bei erhöhtem osmotischen Druck ist die IV-Synthesekette bei Beginn des Wachstums der Zellen auf dem SM-Agar + 1 m KCl - Ileu - Val also intakt. Dies wird durch die Tatsache bewiesen, daß die Zellen bei erhöhtem osmotischen Druck nach einer relativ langen lag-Zeit auf dem IV-freiem SM-Agar mit Teilungsprozessen beginnen. Der Stamm 211-1aM/2 zeigt somit Wachstums- und Teilungsfähigkeit auf IV-freiem Medium bei erhöhtem osmotischen Druck; er kann Makrokolonien bilden und verhält sich also auf diesem Medium bezüglich der Koloniebildungsfähigkeit wie der prototrophe Stamm. Trotzdem besitzt er nicht die dem genotypisch prototrophen Stamm 211-1a/2 nach dieser Vorkultur entsprechende Röntgenempfindlichkeit. Das kann dahingehend interpretiert werden, daß genügend Moleküle des abnorm gefalteten Proteins nach Beendigung der Bestrahlung vorhanden sind, um Strahlenschäden zu reparieren, während die Zellen auf dem SM-Agar + 1 m KCl - Ileu - Val liegen.

¹⁾ Siehe hierzu auch Seite 76.

Durch die Experimente zur Untersuchung des Einflusses der Nachkulturbedingungen ist bereits ausgeschlossen oder unwahrscheinlich gemacht, daß die unter bestimmten Vorkulturbedingungen sich möglicherweise ansammelnde Substanz als Strahlenschutzsubstanz wirkt. Legt man die von HAWTHORNE u. FRIIS (1964) gegebene Interpretation zu Grunde, so wird also nunmehr die Hypothese wahrscheinlicher, daß es sich hier um postirradiative Reparaturprozesse handelt. Als Reparaturenzym könnte das Enzym wirksam sein, das infolge der veränderten Proteinfaltung nicht mehr als Enzym (oder Apoenzym davon) in der IV-Synthesekette wirksam sein kann, sondern nun, infolge der veränderten Faltung eine veränderte Substratspezifität besitzt und in der Lage ist, Strahlenschäden zu reparieren.

Dieses hypothetische Reparaturenzym hat, wie bereits durch die Untersuchungen von LASKOWSKI (1962a; 1962c) erkennbar wurde, eine Spezifität für die Strahlenschäden, die überwiegend in höherploidem Saccharomyces-Zellen zur Unfähigkeit der Koloniebildung führen, nicht aber in haploiden. Diese Ergebnisse haben Ähnlichkeit mit denen von PATRICK u. HAYNES (1964). Auch das (oder die) von diesen Autoren wahrscheinlich gemachte(n) Reparaturenzym(e) ist (sind) nämlich in Röntgen-bestrahlten haploiden Saccharomyces-Zellen unwirksam.

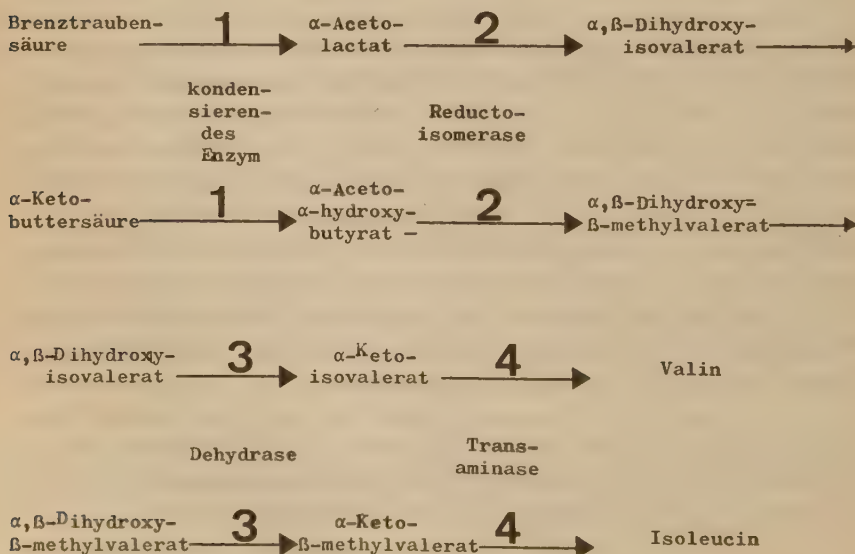
Daß bei dem Stamm 211-1aM/2 der beobachtbare Gewinn an Überlebenden tatsächlich mit der Blockierung der IV-Synthese zusammenhängt, zeigten Versuche von LASKOWSKI (1962c), die an einer Rückmutante (oder Revertante) zur IV-Prototrophie, dem Stamm 211-1a(M)/2, eine Röntgenresistenz analog der des prototrophen Ausgangsstammes 211-1a/2 aufzeigten. Unabhängig davon, ob es sich bei diesem Stamm 211-1a(M)/2 um eine echte Rückmutante oder um eine Suppressormutante handelt, ist auf Grund der neuen Mutation in den Zellen dieses Stammes sicherlich die Fähigkeit zur Synthese von Isoleucin und Valin vorhanden. Mit dem Auftreten dieser Fähigkeit zur Synthese ist dann bei diesem Stamm die relative Röntgen-"Resistenz" wieder verloren gegangen.

Es wäre noch denkbar, daß der nach bestimmten Vorkulturbedingungen bei dem Stamm 211-1aM/2 auftretende Gewinn an Überlebenden nicht durch eine direkt mit dem veränderten Protein zusammenhängende Strahlen-

schadenreparatur zustande kommt. Es könnte auch eine indirekte, auf das IV-Bedürfnis zurückgehende enzymatische Reparatur vorliegen. Mit anderen Worten: Es wäre denkbar, daß durch die Blockierung der IV-Synthese in den Zellen des Stammes 211-1aM/2 das intrazelluläre Reparaturmilieu für andere, bestehende Reparaturenzyme verändert wird.

Wie aber Röntgeninaktivierungsversuche mit anderen IV-bedürftigen Saccharomyces-Stämmen zeigten, die nach Kreuzung mit den hier untersuchten auxotrophen Stämmen nicht komplementierten, wird durch eine Mutation zur IV-Auxotrophie am gleichen locus nicht in jedem Fall ein Röntgenresistenzgewinn erzielt. Es konnte kein weiterer Fall eines mit einer IV-Bedürftigkeit verbundenen Resistenzgewinns höherploidier Stämme beobachtet werden.

Das von der Mutation betroffene Enzymsystem ist bei der IV-bedürftigen Mutante nicht bekannt. Geht man von dem aus Untersuchungen an Hefen entwickelten Syntheschema für Isoleucin und Valin aus (vergleiche beispielsweise KAKAR u. WAGNER, 1964), so stellt man fest, daß vier verschiedene Systeme betroffen sein können:



KOHLHAW (1964) fand, daß wahrscheinlich ein Ausfall des Acetolactat bzw. Acetohydroxybutyrat bildenden Systems für die IV-Bedürftigkeit des Stammes 211-1aM verantwortlich ist. KAKAR (1963) konnte jedoch für alle vier Enzymsysteme bei der Mutante "Aktivitäten nachweisen, die denen des Wildtyps vergleichbar waren."

Durch HAWTHORNE u. FRIIS (1964) ist bekannt, daß bei dem haploiden Stamm 211-1aM der locus is_2 mutiert ist. Obwohl bei dieser Mutante alle vier Enzymsysteme Aktivität zeigen, sind die Zellen des Stammes trotzdem nicht in der Lage, Isoleucin + Valin selbst zu synthetisieren. Auch bei anderen Stämmen von Saccharomyces cerevisiae, bei denen der locus is_2 mutiert ist, ist nicht bekannt, durch welchen Ausfall die Bedürftigkeit für Isoleucin und Valin verursacht wird (vergleiche VON BORSTEL, 1966). Etwas Ähnliches ist für IV-auxotrophe Neurospora-Stämme bekannt (KAKAR, 1963).

Die Ausprägung des "Resistenz"-gewinns bei dem IV-bedürftigen Stamm 211-1aM/2 ist nicht nur von Nachkulturbedingungen, sondern auch deutlich von der Zusammensetzung des Vorkulturmediums abhängig. Wie Abbildung 11 zeigt, verliert der Stamm 211-1aM/2 seine relative Strahlenresistenz gegenüber dem prototrophen Stamm 211-1a/2, wenn die Konzentration an Hefeextrakt $>0,75\%$ und gleichzeitig die Glucosekonzentration $>0,5\%$ ist.

Wie stark die Veränderung der Strahlenresistenz in Abhängigkeit von der Glucose- und der Hefeextraktkonzentration im Vorkulturmedium bei dem Stamm 211-1aM/2 ist, zeigt Abbildung 23. In dieser Abbildung ist der Verlauf der Kurve für die LD_{10} dieses Stammes in Abhängigkeit von der Glucose- und der Hefeextraktkonzentration im Vorkulturmedium dargestellt. Zum Vergleich ist in dieser perspektivischen Darstellung auch der Verlauf der Kurve für die LD_{10} des prototrophen Diploenten 211-1a/2 eingetragen. Man erkennt, daß auch dieser Stamm eine gewisse Abhängigkeit der Strahlenresistenz von der Konzentration der Komponenten des Vorkulturmediums zeigt. Diese ist aber in dem untersuchten Bereich nicht so stark ausgeprägt wie die des Stammes 211-1aM/2. Die Veränderungen der Strahlenempfindlichkeit des prototrophen Stammes

ähneln denen, die GREVE (1961) für einen prototrophen Saccharomyces-Stamm beschrieben hat, und die GREVE unter anderem auf die zunehmende Schutzwirkung von Komponenten im zunehmend konzentrierter werdenden Nährmedium zurückführt.

Wie Abbildung 23 erkennen läßt, ist das Verhalten der Strahlenempfindlichkeit des Stammes 211-1a/2 in den Fällen, in denen überhaupt eine Veränderung der Empfindlichkeit zu beobachten ist, bei Variation der Konzentration der Vorkulturmediums-Komponenten stets dem des Stammes 211-1aM/2 entgegengesetzt. Ein Einfluß des Vorkulturmediums auf die Strahlenempfindlichkeit, wie ihn GREVE beschreibt, ist nur bei dem prototrophen Stamm 211-1a/2 zu beobachten. Es wäre jedoch noch denkbar, daß dieser Einfluß zwar auch bei dem auxotrophen Stamm 211-1aM/2 wirksam ist, aber von der erwähnten, nach bestimmten Vorkulturbedingungen möglichen postirradiativen Reparatur derart überlagert wird, daß der in Abbildung 23 entstehende Verlauf der Kurve für die LD_{10} in Abhängigkeit von den Komponenten des Vorkulturmediums entsteht.

Da in den Saccharomyces-Zellen bei reichlichem Angebot von Glucose bevorzugt andere Glykolyse-Prozesse ablaufen als bei geringem Angebot (vergleiche beispielsweise HOMMES, 1965; 1966), erscheint es weiterhin zunächst nicht unplausibel, eine veränderte Stoffwechsellage infolge dieser Veränderung in der Glykolyse als alleinige Ursache für die bei 1 % Hefeextrakt mit zunehmender Glucosekonzentration im Vorkulturmedium (von 0,1 % bis 1 %) bei dem Stamm 211-1aM/2 abnehmende relative Strahlenresistenz anzusehen. Bei geringerer Hefeextraktkonzentration ($< 0,75$ %) und vergleichbarer Zunahme der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium ist aber der Verlust an Überlebenden nach Röntgenbestrahlung keineswegs so ausgeprägt, womit sich zeigt, daß der Hefeextrakt eine bedeutende Rolle im Zusammenwirken der Mediumkomponenten zur Erzielung eines bestimmten "Resistenz"-grades bei dem Stamm 211-1aM/2 spielt.

Es könnte auch möglich sein, daß der pH-Wert des Vorkulturmediums ganz allgemein auf Stoffwechselprozesse hindeutet, die bei dem Stamm 211-1aM/2 anders ablaufen als bei dem Stamm 211-1a/2. Mißt man den pH-Wert der Hefeextrakt-Glucose-Vorkulturmedien nach Beendigung

der logarithmischen Wachstumsphase der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 (Messung nach etwa 24 Stunden), so findet man eine von der Zusammensetzung des Mediums abhängende, verschieden starke Veränderung des pH des Mediums gegenüber dem pH-Wert der unverbrauchten Medien. Während die Medien im allgemeinen während des Wachstums der Zellen angesäuert werden, wird bei geringen Glucosekonzentrationen und relativ hohem Yeast-Extract-Gehalt ein pH-Wert jenseits des Neutralpunktes bis etwa $\text{pH} = 8,3$ erreicht (siehe hierzu die Tabelle 3, Seite 80). Die beiden Stämme unterscheiden sich untereinander in der Veränderung des ~~pH~~^{Werts} des Mediums aber nicht.

In Abbildung 24 sind die pH-Werte von Hefeextrakt-Glucose-Medien nach dem Wachstum der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Mediumkomponenten dargestellt.

Wie ein Vergleich dieser in Abbildung 24 dargestellten pH-Werte mit den in Abbildung 11 dargestellten Dosisreduktionswerten erkennen läßt, besteht kein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert des verbrauchten Vorkulturmediums und der Strahlenresistenz der Zellen, die in den entsprechenden Medien gewachsen waren (Abbildung 25). Der Stamm 211-1aM/2 ist also beispielsweise nicht immer dann strahlenresistenter als der Stamm 211-1a/2, wenn der pH-Wert am Ende des Wachstums der Kultur relativ hoch ist.

Diese Befunde werden bestätigt durch die Ergebnisse der Untersuchungen zur Abhängigkeit der Strahlenresistenz der beiden Diplonten von der Zusammensetzung des synthetischen Vorkulturmediums. Obwohl dieses Medium relativ sauer ($\text{pH} = 3,7$) ist, ist der Stamm 211-1aM/2 unabhängig von der Glucosekonzentration in diesem Vorkulturmedium zwischen 0,25 % und 2 % stets resistenter als der Stamm 211-1aM/2. Der pH-Wert des verbrauchten Vorkulturmediums ist also auch kein Indiz für unterschiedliche Stoffwechselprozesse in den Zellen der beiden Diplonten.

Tabelle 3.

pH-Werte in verbrauchten Wachstumsmedien nach Beendigung des logarithmischen Wachstums der Zellen in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration an Hefeextrakt und Glucose.

Messung von Medien mit Zellen nach 24-26 Stunden Wachstum in 5 ml Medium.
Messung mit einem pH-Meter (Kalomel-Elektrode) bei Zimmertemperatur.

S i e h e a u c h A b b . 2 4.

Stamm 211-1a/2 (=a/2)

Stamm 211-1aM/2 (=M/2)

		% G l u c o s e									
		0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	8,0
Yeast - E x t r a c t	0,1 a/2	6,0	4,4	3,6	3,4	3,4	3,4	3,3	3,3	3,4	3,3
	0,1 M/2	6,1	3,9	3,5	3,3	3,2	3,1	3,0	3,0	2,9	2,9
	0,2 a/2	7,0						3,6			
	0,2 M/2	7,2						3,1			
	0,3 a/2	7,5						3,9			
	0,3 M/2	7,6						3,7			
	0,4 a/2	7,8						4,4			
	0,4 M/2	7,9						4,0			
	0,5 a/2	8,0	7,0	6,2				4,6			
	0,5 M/2	8,0	7,0	6,3				4,5			
	0,75 a/2	8,3		7,2				5,3			
	0,75 M/2	8,1		7,4				5,5			
	1,0 a/2	8,4	8,0	7,6	7,3	6,9	6,6	6,0	5,4	4,7	3,9
	1,0 M/2	8,1	7,7	7,5	7,2	7,0	6,4	6,3	5,8	5,2	4,3
	1,5 a/2	8,3						6,9			
	1,5 M/2	8,2						7,5			
	2,0 a/2	8,4						7,8			
	2,0 M/2	8,1						8,4			

Die Strahlenresistenz des Stammes 211-1aM/2 ist unabhängig von der Konzentration der anderen Komponenten des synthetischen Vorkulturmediums. Von einfacher bis zehnfacher Konzentration der Komponenten des Mediums zeigt sich keine Abhängigkeit der Strahlenresistenz (siehe die Abbildungen 12a, 12b, 12c). Da der Stamm 211-1aM/2 nach einer Vorkultur in einem Hefeextraktmedium, das anstelle Glucose Natriumlactat enthält, ebenfalls resistenter als der Stamm 211-1a/2 bleibt, - unabhängig von der Konzentration des Lactats - scheint für die Aktivität des Reparaturenzyms bei dem Stamm 211-1aM/2 nicht die Konzentration der Glucose und auch nicht die Konzentration des Hefeextrakts selbst verantwortlich zu sein. Es scheint vielmehr auf nicht bekannte Stoffwechselprodukte aus der Glykolyse anzukommen, die im Zusammenwirken mit dem Hefeextrakt (oder Abbauprodukten des Hefeextrakts) die Wirksamkeit des Enzyms verändern können.

Ist von dem Hefeextrakt im Vorkulturmedium relativ viel vorhanden, so kann das Enzym gehemmt werden. Ist von dem Hefeextrakt (am Anfang des Wachstums der inokulierten Zellen) im Vorkulturmedium wenig vorhanden, so kann das Enzym nicht gehemmt werden. Da nach Vorkulturen mit synthetischem Medium, in dem Hefeextrakt fehlt, dieser Hemmeffekt nicht beobachtet werden kann, scheint für die Hemmung des Enzyms eine Substanz aus dem Hefeextrakt verantwortlich zu sein, die im SM nicht enthalten ist. Im Hefeextrakt sind sicherlich Nucleinsäuren und Polypeptide enthalten, die im SM fehlen. Man wird also eine kompetitive Hemmung der Reparaturaktivität des Enzyms durch eine dieser, nur im Hefeextrakt enthaltenen Substanzen annehmen können.

Die kompetitive Hemmung kann eintreten, wenn $> 0,5$ % Glucose zu Beginn des Wachstums der inokulierten Zellen im Vorkulturmedium vorhanden waren. War die Glucosekonzentration geringer als 0,5 %, so wurden (möglicherweise) nicht genügend der (oder des) Stoffwechselprodukte(s) gebildet, die in Zusammenwirkung mit dem Hefeextrakt (oder Abbauprodukten davon) die Hemmwirkung auf die Enzymaktivität entfalten können.

Werden die Zellen des Stammes 211-1aM/2, in denen das Reparaturenzym ungehemmt vorliegen kann (also beispielsweise bei Zellen aus einem Vorkulturmedium mit geringem Glucose- und/oder geringem Hefeextraktgehalt), nach der Bestrahlung auf ein Medium gebracht, das relativ sauer ist, so wird offensichtlich durch die starke Azidität des Nachkulturmediums die Aktivität des Enzyms blockiert. Offensichtlich besitzt das Enzym für die Reparaturaktivität ein pH-Optimum, das nahe dem pH-Wert von VM liegt. Diese Ergebnisse sind mit denen von PATRICK u. HAYNES (1964) vergleichbar, die ein breites pH-Optimum des (der) von ihnen wahrscheinlich gemachten Recovery-Enzyms (Enzyme) bei pH = 6 fanden. Zwischen pH = 4 und pH = 8 konnte deutliche Recovery beobachtet werden.

Im Folgenden sei noch einmal zusammenfassend auf diejenigen Befunde hingewiesen, die sich im Rahmen der hier aufgestellten Hypothese nicht oder nur schlecht erklären lassen:

Bei postirradiativem Wachstum der Zellen des Stammes 211-1aM/2 auf SM-Agar + 18 AS, dessen pH-Wert von etwa 3,5 dem des SM ohne Zusätze etwa gleich ist, kann - nach bestimmten Vorkulturbedingungen - das Reparaturenzym wirksam werden, während es nach den gleichen Vorkulturbedingungen bei Wachstum der Zellen auf SM-Agar in der Aktivität gehemmt ist. Es ist unklar, welche Einflüsse hier zu einer Reversion der angenommenen Aktivitätshemmung infolge des geringen pH-Werts des Mediums führen. Die starke Wachstumsverlangsamung, wie sie bei dem Stamm 211-1aM/2 in SM + 18 AS beobachtet werden kann, scheint als Ursache ausgeschlossen zu sein.

Die relativ höhere Zahl an Überlebenden bei dem Stamm 211-1aM/2 auf SM-Agar + 1 m KCl - Ileu - Val gegenüber dem Stamm 211-1a/2 nach Vorkultur in YG ist ebenfalls im Rahmen der aufgestellten Hypothese nur schlecht verständlich. Obwohl die Zugabe von KCl zu dem synthetischen Medium den pH-Wert nicht verändert, können sich bei gleicher Dosis auf diesem Medium fast gleiche Prozentsätze an Überlebenden bilden, wie auf dem VM-Agar. Allerdings wachsen auf SM-Agar + 1 m KCl - Ileu - Val bei den unbestrahlten Kontrollen nur etwa 50 % der auf VM-Agar koloniebildungsfähigen Zellen zu Kolonien heran. Es ist daher nicht ohne weiteres zulässig, die Dosiseffektkurven, die für den Stamm 211-1aM/2 bei Nachkultur auf diesem Medium gewonnen werden können,

mit denen bei Nachkultur auf VM-Agar zu vergleichen. So müßte beispielsweise zunächst sichergestellt sein, daß die bestrahlten überlebenden Zellen auf dem SM-Agar + 1 m KCl - Ileu - Val der gleichen Grundgesamtheit entstammen wie die nur zu etwa 50 % koloniebildungsfähigen Zellen der unbestrahlten Kontrolle des gleichen Mediums.

Auch der "Röntgenresistenz stabilisierende" Einfluß der Heterozygotie der Paarungstypallele konnte nicht geklärt werden. Bei einer Heterozygotie der Paarungstypallele bleibt unabhängig von der Konzentration der Komponenten des Vorkulturmediums der mit der Aminosäurebedürftigkeit verbundene Gewinn an Überlebenden erhalten.

Abschließend sei noch einmal kurz das Für und Wider zu der aufgestellten Hypothese dargelegt, bei der man eine postirradiative Reparatur in den Zellen des IV-bedürftigen Diplonten 211-1aM/2 annimmt, die durch ein Enzym bewirkt wird, das aus einem metabolischen Enzym entstanden ist.

HAWTHORNE u. FRIIS (1964) fanden für den IV-bedürftigen haploiden Stamm 211-1aM Eigenschaften, die sie als charakteristisch für Missens-Mutanten interpretierten. Die gleichen Eigenschaften wurden auch bei dem - aus dem Haplonten durch Selbstdiploidisierung entstandenen - Diplonten 211-1aM/2 beobachtet. Dieser Diplont zeichnet sich nun weiterhin durch eine bestimmte Strahlen-"Resistenz" aus, die durch Vorkulturbedingungen beeinflussbar ist [gleiche Ergebnisse auch bei HAEFNER, (1965)]. Auch die Nachkulturbedingungen, beispielsweise der pH-Wert des Mediums, beeinflussen die Überlebensrate dieses Stammes. Nimmt man nun an, daß nach der Bestrahlung hauptsächlich Reparaturprozesse beeinflusst werden, so bietet sich als Erklärung an, daß in den Zellen des Stammes 211-1aM/2 pH-abhängige postirradiative Reparaturprozesse möglich sind. Solche Prozesse wurden unter anderem von PATRICK u. HAYNES (1964) beschrieben und als Recovery bezeichnet. Die Recovery ist sehr wahrscheinlich enzymatisch gesteuert (vergleiche beispielsweise HANAWALT u. HAYNES, 1967; HAYNES, 1964).

Nach HAWTHORNE u. FRIIS kann man annehmen, daß durch die Missens-Mutation in den Zellen des Stammes 211-1aM/2 ein (ehemals sicherlich an der Synthese von Isoleucin und Valin oder deren Vorläufern beteiligtes) Enzym entstanden ist, dessen Protein durch den Einbau einer "falschen" Aminosäure eine neuartige Faltung erhalten hat, die dieses dergestalt veränderte Enzym für die ursprüngliche Aufgabe unbrauchbar macht.

Durch die veränderte Faltung des Proteins könnte nun das "nutzlose" Enzym zufällig eine gerade derartig veränderte Substratspezifität erhalten haben, daß es in der Lage ist, einen bestimmten, vor allem in höherploidigen Zellen auftretenden Typ von durch ionisierende Strahlen gesetzten Schäden zu reparieren. Auch die Recovery ist nur bei höherploidigen Zellen, jedoch nicht bei haploiden zu beobachten (vergleiche beispielsweise PATRICK, HAYNES u. URETZ, 1964; BACCHETTI et al., 1965).

Die Recovery kann den mit der IV-Bedürftigkeit verbundenen "Resistenz"-gewinn noch überlagern. Werden andererseits die Vorkulturbedingungen so gewählt, daß sich der mit der Bedürftigkeit verbundene "Resistenz"-Effekt nicht einstellt, so ist trotzdem die Recovery möglich.

Der mit der IV-Bedürftigkeit verbundene "Resistenz"-Effekt stellt sich nicht ein, wenn die Zellen in einem Vorkulturmedium mit reichlichem Gehalt an Hefeextrakt und/oder Glucose vorgezüchtet werden. Ist eine der Komponenten im Vorkulturmedium nur schwach konzentriert oder fehlt sie völlig, so stellt sich stets der "Resistenz"-Effekt ein. Das ist erklärbar, wenn man annimmt, daß in dem Hefeextrakt Bestandteile (beispielsweise Proteine und Nucleinsäuren) enthalten sind, die die Aktivität des Reparaturenzyms kompetitiv hemmen. Diese Hemmung kann jedoch nur zustande kommen, wenn auch reichlich Glucose zu Beginn des Wachstums der Zellen im Vorkulturmedium vorhanden war. Da die Strahlenschadenreparatur erst nach einer Bestrahlung beginnen kann, zu diesem Zeitpunkt aber sowohl der Hefeextrakt als auch die Glucose des Vorkulturmediums in den bestrahlten Zellen sicherlich weitgehend metabolisiert sind, scheint es bei der kompetitiven Hemmung der Enzymaktivität besonders auf die Stoffwechselprodukte aus dem Hefeextrakt in Verbindung mit Stoffwechselprodukten aus der Glucose anzukommen.

Unklar ist, warum der mit der IV-Bedürftigkeit verbundene "Resistenz"-gewinn unabhängig von den Vorkulturbedingungen erhalten bleibt, wenn im Genom der Saccharomyces-Zellen die Paarungstypallele nicht mehr homozygot, sondern heterozygot *aa* vorliegen.

Desgleichen ist unklar, über welche Mechanismen der Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität des Reparaturenzyms verändert wird. So ist beispielsweise nicht erkennbar, warum die Aktivität des Reparaturenzyms nach der Bestrahlung bei pH = 3,5 einmal blockiert ist und ein andermal bei einem anderen Nachkulturmedium nicht blockiert zu sein scheint.

Die Erscheinung der veränderten Substratspezifität eines metabolischen Enzyms zu einem Strahlenschaden reparierenden Enzym ist sicherlich höchst selten. Es ist also beispielsweise nicht zu erwarten, daß die beiden anderen, von HAWTHORNE u. FRIIS gefundenen, als Missens-Mutanten interpretierten IV-bedürftigen Saccharomyces-Stämme einen mit dem hier beschriebenen vergleichbaren Gewinn an Überlebenden nach Röntgenbestrahlung gegenüber dem jeweiligen unmutierten IV-prototrophen Ausgangsstamm aufweisen ¹⁾. Dies wird auch durch die Ergebnisse der Untersuchungen anderer IV-bedürftiger Saccharomyces-Stämme bestätigt. Bei Überprüfung dieser Stämme, die teils mit dem haploiden Stamm 211-1aM bezüglich der IV-Bedürftigkeit komplementierten, teils nicht komplementierten, konnte kein weiterer entsprechender Fall eines Resistenzgewinns gegenüber dem jeweiligen prototrophen Vergleichsstamm beobachtet werden. Ein solcher Fall wäre auch, selbst bei Mutanten mit Blockierung der IV-Synthese auf Grund einer Mutation am gleichen locus, sehr unwahrscheinlich.

¹⁾ LASKOWSKI (1962a) beschreibt einen weiteren, mit einer Serin-Bedürftigkeit verbundenen Resistenzgewinn höherploidier Saccharomyces-Stämme. Diese Stämme wurden in die Untersuchungen nicht mit einbezogen. Es scheint aber ziemlich ausgeschlossen, daß auch diese Stämme alle die für die IV-bedürftigen gefundenen und für die aufgestellte Hypothese kritischen Eigenschaften aufweisen.

So ist es beispielsweise schon relativ unwahrscheinlich, daß die Serin-bedürftigen Stämme ebenfalls die den Missens-Mutanten zugeschriebenen Eigenschaften aufweisen.

Ein Schritt, der von einem metabolischen Enzym zu einem Reparaturenzym führt und hier durch eine Mutation bewältigt sein müßte, erscheint als recht groß, da die Reparatur von Makromolekülen in der Zelle sicherlich einen höheren Grad an "Spezialisierung" verlangt, als er allgemein bei rein metabolischen Enzymen ausgeprägt ist. Ein Reparaturenzym besitzt daher möglicherweise ein höheres Molekulargewicht als ein metabolisches Enzym. Trotz dieser Bedenken sind aber die hier vorliegenden Ergebnisse mit dem entwickelten Modell am besten vereinbar.

Auch bei anderen Organismen ist - teilweise schon seit längerer Zeit - ein Einfluß von Vor- und Nachkulturbedingungen auf die Inaktivierung durch Strahlen verschiedener Qualität bekannt (vergleiche beispielsweise STAPLETON, 1955). KALLE u. SIVASUBRAMANIAN (1967) zeigten vor kurzem, daß bei einer Thymin-bedürftigen Mutante von Escherichia coli B die Resistenz gegenüber UV-Bestrahlung von der Zusammensetzung des Vorkulturmediums beeinflussbar ist. Sie deuteten den durch das Medium beeinflussbaren "Resistenzfaktor" als "etwas Enzymatisches, das an der postirradiativen Reparatur des UV-induzierten Schadens in der Zelle beteiligt ist". Diese Ergebnisse scheinen also etwas Ähnliches anzudeuten, wie die hier dargestellten Ergebnisse nach Röntgenbestrahlung bei Saccharomyces-Zellen nahelegen.

Zum Schluß sei noch auf die mögliche evolutionistische Bedeutung einer solchen "Fehlsinn"-Mutante, die eine auf vielen Wachstumsmedien unwichtige Synthesefähigkeit verliert und statt dessen eine Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen gewinnt, hingewiesen. Bei einer Spekulation über das erste Auftreten oder Wiederauftreten einer Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen könnte man an intrazelluläre Verhältnisse denken, wie sie hier näher untersucht wurden. Durch einen einzelnen Mutationsschritt gewinnt eine Zelle aus einem Synthese-Enzym ein Reparaturenzym und damit einen Selektionsvorteil in der durch das Auftreten ionisierender Strahlen veränderten Umwelt.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Der in einem weitestgehend isogenen und homozygoten Stammsystem von Saccharomyces verbunden mit dem von einem Gen gesteuerten Isoleucin- und Valin-(= IV) Synthesedefekt bei den Diplonten auftretende Röntgenstrahlenresistenzgewinn erwies sich als abhängig von bestimmten Vorkultur- und Nachkulturbedingungen. Die gleichen Vorkultur- und Nachkulturbedingungen beeinflussten die entsprechenden Haplonten nicht.

Die bei dem IV-auxotrophen homozygoten Diplonten relativ zum prototrophen homozygoten Diplonten erhöhte Überlebensrate (Kriterium: Unbegrenztes Zellteilungsvermögen) war bei konstanter Nachkultur abhängig von der Glucosekonzentration und der Konzentration an Yeast-Extract im Vorkulturmedium. Die erhöhte Überlebensrate konnte in Abhängigkeit von dem Vorkulturmedium in eine relativ zum prototrophen Diplonten verringerte Rate überführt werden (negativer Resistenzeffekt).

Die erhöhte Überlebensrate war bei konstanter Vorkultur abhängig von dem pH-Wert des Nachkulturmediums und konnte durch 48stündiges Festlegen der bestrahlten Zellen auf 2 %-Glucose-Agar und anschließendes Bebrüten mit Nachkulturmedium (Zellfixier-Technik zur Recovery) noch zusätzlich erhöht werden. Ergänzende Untersuchungen bei Variation der Vorkulturbedingungen zeigten, daß die mit der IV-Bedürftigkeit verbundene angenommene Strahlenschadenreparatur und die Recovery zwei voneinander unabhängige Prozesse sind.

Der IV-bedürftige Diplont erwies sich ebenso wie der entsprechende isogene IV-bedürftige Haplont als osmotisch heilbar, was im Zusammenhang mit den anderen Ergebnissen als Hinweis auf eine Missens-Mutante interpretiert wurde, die infolge der Missens-Mutation ein zum Reparaturenzym verändertes, aus der IV-Synthesekette abgeleitetes ehemals metabolisches Enzym besitzt.

- BACCHETTI, S. u. MAURO, F., 1965: Rad. Res. 25: 103 - 114.
Recovery from sublethal X-ray damage
in surviving yeast cells.
- BACCHETTI, S., ELLI, R., FALCHETTI, R., MAURO, F. u.
SACCHI, A., 1965: Int. J. Rad. Biol. 10: 213 - 221.
Recovery from X-ray induced sub-lethal
damage in Saccharomyces cells of different
ploidy.
- BACCHETTI, S., CASSANDRO, M., ELLI, R., FALCHETTI, R. u.
MAURO, F., 1966: Rad. Res. 29: 295 - 315.
Relationship between recovery from sub-
lethal damage by dose fractionation and
the restoration of viability after delayed
plating in Saccharomyces cerevisiae.
- BARSUKOW, W.S., MALINOWSKI, O.W. u.
MITJUSCHOWA, N.M., 1963: Dokl. Akad. Nauk SSSR 151: 209 - 212.
Die Dynamik der Reaktivierung von Hefezel-
len nach Bestrahlung in Abhängigkeit von
der Gammabestrahlungsdosis.
- BEAM, C.A., MORTIMER, R.K., WOLFE, R.G. u.
TOBIAS, C.A., 1954: Arch. Biochem. Biophys. 49: 110 - 122.
The relation of radioresistance to budding
in Saccharomyces cerevisiae.
- BEAM, C.A., 1955: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 41: 857 - 861.
The influence of ploidy and division stage
on the anoxic protection of Saccharomyces
cerevisiae against X-ray inactivation.
- VON BORSTEL, R.C., 1966 (Hrsg.): Microbial genetics bulletin
No. 25. November 1966, Seite 6 - 7.
Biology Division Oak Ridge, Natl. Laboratory.
P.O. Box Y.
- ELDJARN, L. u. PIHL, A., 1961: In ERRERA u. FORSSBERG (Hrsg.)
"Mechanisms in Radiobiology", Band II.
Kapitel 4: "Mechanisms of protective and
sensitizing action".
New York und London, Academic Press.
- GREVE, E., 1961: Z. Naturforschg. 16 b: 589 - 594.
Über den Einfluß verschiedener Kohlehydrat-
quellen und der osmotischen Verhältnisse
auf die Strahlenempfindlichkeit der Zellen
von Saccharomyces cerevisiae.

- HAEFNER, K., 1961: Diplomarbeit Freie Universität Berlin, Math.-Nat. Fakultät.
Untersuchung der Induktion prototropher Mutanten durch ultraviolettes Licht bei Saccharomyces in Abhängigkeit von Dosis und Nachbehandlung.
- HAEFNER, K., 1965: Dissertation Freie Universität Berlin.
Zur Analyse der strahleninduzierten Inaktivierung und Mutabilität von Saccharomyces-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades.
- HANAWALT, P.C. u. HAYNES, R.H., 1967: Sci. american 216, No. 2: 36 - 43.
The repair of DNA.
- HART, E.J. u. PLATZMAN, R.L., 1961: In ERRERA u. FORSSBERG (Hrsg.) "Mechanisms in Radiobiology", Band I. Kapitel 2: "Radiation Chemistry". New York und London, Academic Press.
- HAWTHORNE, D.C. u. FRIIS, J., 1964: Genetics 50: 829 - 839.
Osmotic-remedial mutants. A new classification for nutritional mutants in yeast.
- HAYNES, R.H., 1964: Photochem. Photobiol. 3: 429 - 450.
Role of DNA repair mechanisms in microbial inactivation and recovery phenomena.
- HEMPEL, S., 1964: Diplomarbeit Freie Universität Berlin, Math.-Nat. Fakultät.
Vergleichende Untersuchungen strahleninduzierter Atmungs-, Gärungs- und Knospungshemmungen bei Hefen unter besonderer Berücksichtigung der Dosisabhängigkeit.
- HEMPEL, S. u. LASKOWSKI, W., 1964: Naturforschg. 19 b: 929 - 935.
Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. VII. Vergleichende Untersuchung Strahlen- und Bernsteinsäureperoxyd-induzierter Atmungs-, Gärungs- und Knospungshemmungen.
- HILZ, H. u. ECKSTEIN, H., 1964: Biochem. Z. 340: 351 - 382.
Teilungssynchronisierte Hefezellen I. Unterschiedliche Wirkungen von Röntgenstrahlen und cytostatischen Verbindungen auf Stoffwechsel und Zellteilung.
- HOMMES, F.A., 1965: Arch. Biochem. Biophys. 109: 168 - 172.
Metabolic control mechanisms in yeast grown with different glucose concentrations.

- HOMMES, F.A., 1966: Arch. Biochem. Biophys. 113: 324 - 330.
Mechanisms of the crabtree effect in yeast grown with different glucose concentrations.
- KALLE, G.P. u. SIVASUBRAMANIAN, P.P., 1967: Rad. Res. 30: 71 - 80.
Filament formation in ultraviolet-resistant mutants of Escherichia coli strain B₃.
- KAKAR, S.N., 1963: Persönliche Mitteilung.
- KAKAR, S.N. u. WAGNER, R.P., 1964: Genetics 49: 213 - 222.
Genetic and biochemical analysis of iso-leucine-valine mutants of yeast.
- KOHLHAW, G., 1964: Persönliche Mitteilung.
- KOROGODIN, V.I., 1958: Biophysics 3: 189.
Forms of inactivation of yeast cells by ionizing radiation.
- LASKOWSKI, W. u. STEIN, W., 1958: Z. Naturforschg. 13 b: 305 - 314.
Mikroskopischer Vergleich der Zellvermehrung bei Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades nach UV- und Peroxyd-Inaktivierung.
- LASKOWSKI, W., 1960: Z. Naturforschg. 15 b: 495 - 506.
Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. I. Aufbau homozygoter Stämme und Dosis-effektkurven für ionisierende Strahlen, UV und organische Peroxyde.
- LASKOWSKI, W., 1962a: Z. Naturforschg. 17 b: 93 - 108.
Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. VI. Über den Aufbau weitestgehend isogener, homozygoter penta- und hexaploider Stämme sowie den Einfluß bestimmter mutierter Allele auf die Strahlenresistenz.
- LASKOWSKI, W., 1962b: Zbl. Bakt. Orig. Zentr. Bakteriöl. Parasitenkd. Abt. I. 184: 251 - 258.
Der $\alpha\alpha$ -Effekt, eine Korrelation zwischen Paarungstypkonstitution und Strahlenresistenz bei Hefen.
- LASKOWSKI, W., 1962c: Abh. Dt. Akad. Wiss. Berlin. Klasse Medizin 1962, Nr. 1: 171 - 177.
Strahleninaktivierung von Saccharomyces in Abhängigkeit von Ploidiegrad und Genotyp.

- LATARJET, R., 1943: C. r. Acad. Sci. (Paris) 217: 186 - 188.
Action du froid sur la réparation des radiolésions chez une levure et chez une bactérie.
- LEDERBERG, J. u. LEDERBERG, E.M., 1952: J. Bacteriol. 63: 399 - 406.
Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.
- LUCKE, W.H. u. SARACHEK, A., 1953: Nature (London) 171: 1014 - 1015.
X-ray inactivation of polyploid Saccharomyces.
- LYMAN, J.T., 1965: Ph. D. Thesis University of California, Berkeley, California, USA.
Dark recovery of yeast following ionizing radiations.
- MORTIMER, R.K., 1958: Rad. Res. 9: 312 - 326.
Radiobiological studies and genetic analysis on a polyploid series (haploid to hexaploid) of Saccharomyces cerevisiae.
- MORTIMER, R.K., 1961: Brookhaven Symposia in Biology 14: 62 - 75.
Factors controlling the radiosensitivity of yeast cells.
- MCUSTACCHI, E. u. MARCOVICH, H., 1962: Ann. Inst. Pasteur 103: 841-865.
Effets des désintégrations du phosphore 32 incorporé dans la levure Saccharomyces cerevisiae. I. Induction d'une mutation vers la résistance à l'effet létal des rayons X.
- MOUSTACCHI, E., 1963: Ann. Inst. Pasteur 105: 757 - 773.
Mécanisme de la radiorésistance des levures en bourgeonnement. Influence de certains facteurs métaboliques.
- OGUR, M., JOHN, R.St. u. NAGAI, S., 1957: Science 125: 928 - 929.
Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast.
- OWEN, M.E. u. MORTIMER, R.K., 1956: Nature (London) 177: 625 - 626.
Dominant lethality induced by X-rays in haploid Saccharomyces cerevisiae.

- PATRICK, M.H., HAYNES, R.H. u.
URETZ, R.B., 1964: Rad. Res. 21: 144 - 163.
Dark recovery phenomena in yeast.
I. Comparative effects with various
inactivating agents.
- PATRICK, M.H. u. HAYNES, R.H., 1964: Rad. Res. 23: 564 - 579.
Dark recovery phenomena in yeast.
II. Conditions that modify the
recovery process.
- POHLIT, W. u. DOMKE, A., 1966a: Biophysik 3: 44 - 64.
Kybernetische Untersuchungen zur Strahlenwirkung auf Hefezellen. I. Vermehrung ideal homogener und synchronisierter Zellpopulationen.
- POHLIT, W. u. DOMKE, A., 1966b: Biophysik 3: 140 - 147.
Kybernetische Untersuchungen zur Strahlenwirkung auf Hefezellen. II. Induktion von Lagzeiten und Entwicklung von Riesenzellen nach Röntgenbestrahlung.
- POHLIT, W., LASKOWSKI, W. u.
LOCHMANN, E.R., 1966: Z. Naturforschg. 21 b: 1089 - 1096.
Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. VIII. Untersuchungen zum Kohlenstoff-Stoffwechsel unbestrahlter Zellen.
- SCHÄDEL, U., LOCHMANN, E.R. u.
LASKOWSKI, W., 1966: Nature (London) 211: 431 - 432.
Cysteine incorporation and radioprotection in Saccharomyces.
- SEIDEL, H.W., 1961: Diplomarbeit Freie Universität Berlin, Math.-Nat. Fakultät.
Bestimmung der spektralen Energieverteilung einer Röntgenhochleistungsröhre im Bereich von 10 - 60 KV bei verschiedener Vorfilterung auf der Basis von Drehkristall-, Diskriminator- und Absorptionsmessungen.
- SHERMAN, F., 1963: Genetics 48: 375 - 385.
Respiration-deficient mutants of yeast.
I. Genetics.
- STAPLETON, G.E., 1955: Ann. N.Y. Acad. Sci. 59: 604 - 618.
The Influence of Pretreatments and Post-treatments on Bacterial Inactivation by Ionizing Radiations.

- STEIN, W. u. LASKOWSKI, W., 1960: Z. Naturforschg. 15 b: 734 - 743.
Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. IV. Quantitative Deutung unter Berücksichtigung genetischer und nicht-genetischer Anteile.
- UHL, A., 1960: In: REIFF, R., KAUTZMANN, R., LÜERS, H. u. LINDEMANN, M.: "Die Hefen", Band I.
2. Ernährungsgrundlage der Hefen, Seite 215 ff.: Kohlenstoffquellen. Nürnberg; Verlag Hans Carl.
- WEISS, J., ALLEN u. SCHWARZ, 1955: Genfer Konferenz 1955 P/155.
Zitiert bei SCHMIDT, W.F., 1966: Z. Naturforschg. 21 b: 145 - 147.
Zum Strahlenschutz von Glycerin bei Hefezellen verschiedenen Ploidiegrades.
- WHITE, J., 1954: Yeast Technology. Seite 280 - 285.
London; Chapman u. Hall.
- WITT, I., KRONAU, R. u. HOLZER, H., 1966: Biochem. Biophys. Acta 118: 522 - 537.
Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefen durch Glucose.
- WOOD, T.H., 1959: Rad. Res. Suppl. 1: 332 - 346.
Inhibition of cell division.

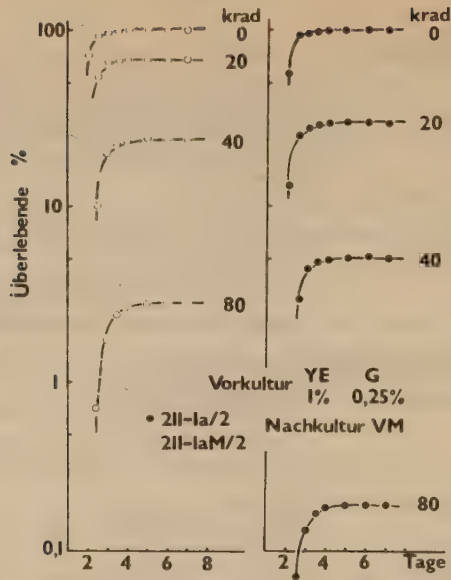


Abb. 1a

Bildung makroskopischer Kolonien auf VM-Agar bei den Stämmen 211-1a/2 und 211-1aM/2 bei verschiedenen Bestrahlungsdosen in krad in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit. Überlebende in % der entsprechenden Kontrollen gleichen Alters. Unbestrahlte in % des maximalen Endwerts der Kontrolle.

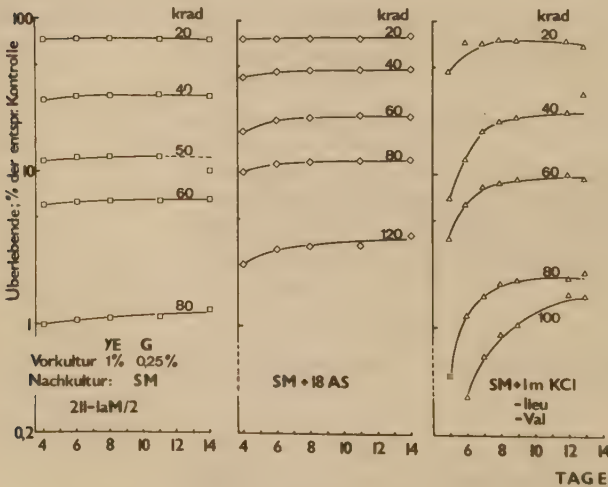


Abb. 1b

Bildung makroskopischer Kolonien auf verschiedenen Medien bei dem Stamm 211-1aM/2 bei verschiedenen Bestrahlungsdosen in krad in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit. Überlebende in % der entsprechenden Kontrolle gleichen Alters.

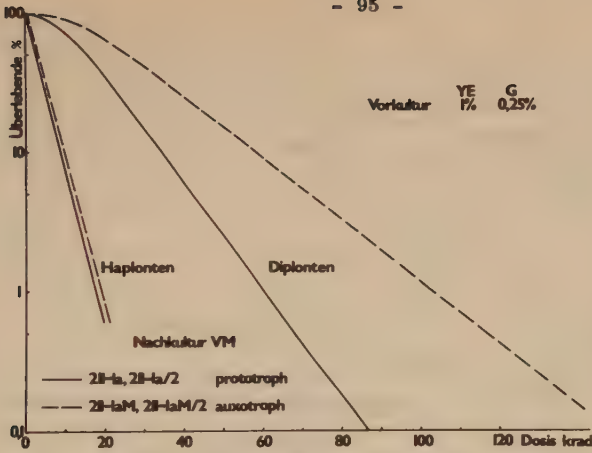


Abb. 2 Röntgendosiseffektkurven für die Stämme
 211-1a (prototroph, haploid) 211-1a/2 (prototroph, diploid)
 211-1aM (auxotroph, haploid) 211-1aM/2 (auxotroph, diploid).
 Ungefähr maximaler "Resistenzeffekt".

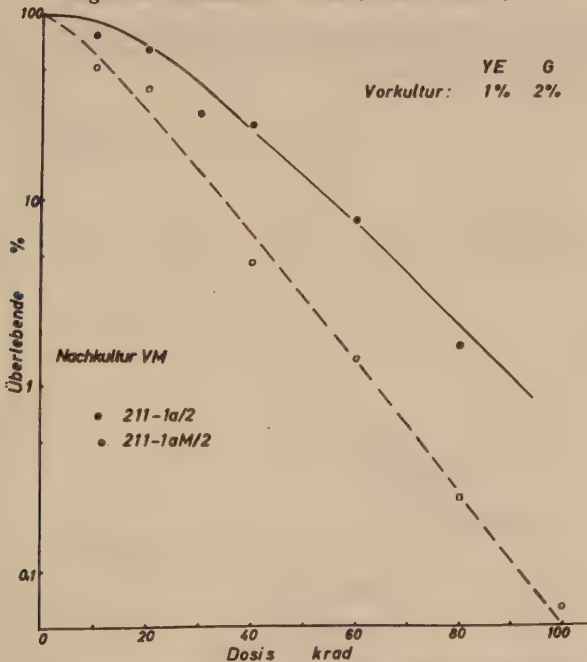


Abb. 3 Röntgendosiseffektkurven für die diploiden Stämme
 211-1a/2 (prototroph) und 211-1aM/2 (auxotroph).
 Ungefähr maximaler "negativer Resistenzeffekt".



Abb. 4 Überlebende nach Röntgenbestrahlungen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium bei drei verschiedenen Strahlendosen von 20, 40 und 80 krad.

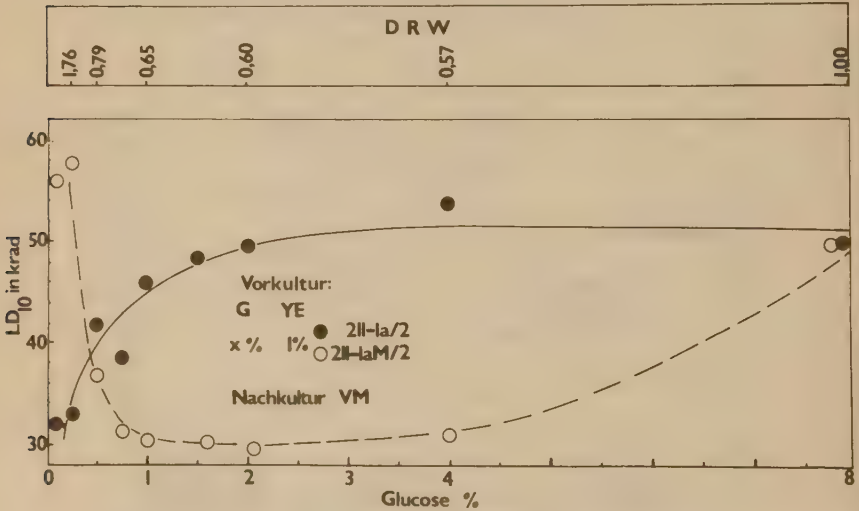


Abb. 5 LD_{10} in krad für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium sowie Dosisreduktionswerte an bestimmten Punkten, stets gebildet aus $DRW = \frac{LD_{10} \text{ 211-1aM/2}}{LD_{10} \text{ 211-1a/2}}$, für bestimmte Glucosekonzentrationen.

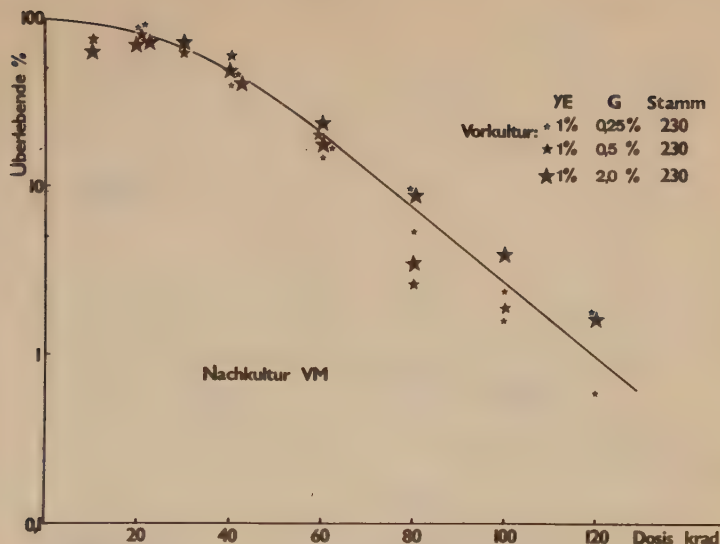


Abb. 6 Röntgendosiseffektkurve für den Stamm 230. Anzucht der Zellen in Vorkulturmedien mit verschiedener Glucosekonzentration.

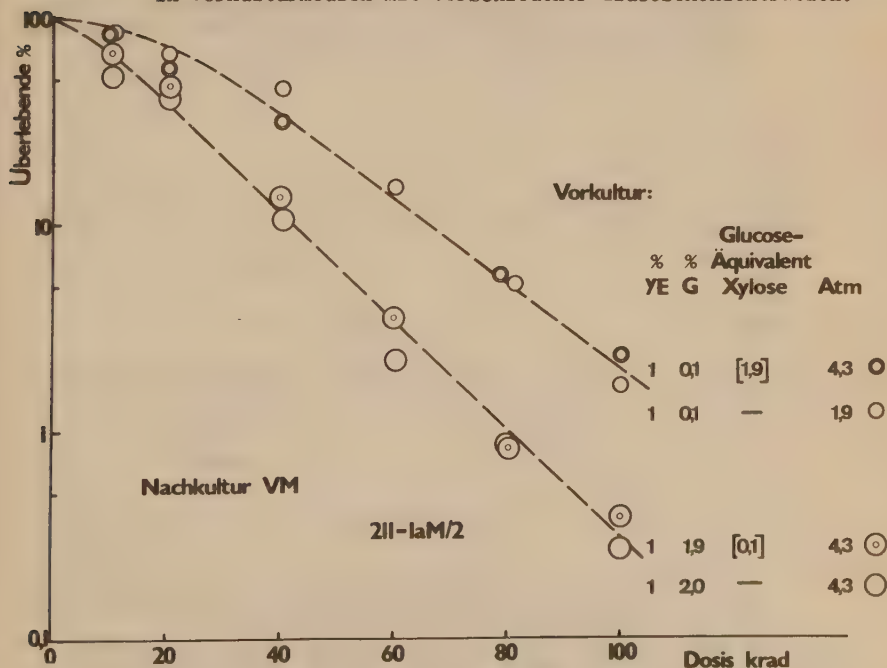


Abb. 7 Röntgendosiseffektkurven für den Stamm 211-1aM/2 nach Anzucht in Vorkulturmedien mit unterschiedlicher Glucosekonzentration, denen zwecks Erhöhung des osmotischen Drucks D(+)-Xylose zugesetzt worden war.

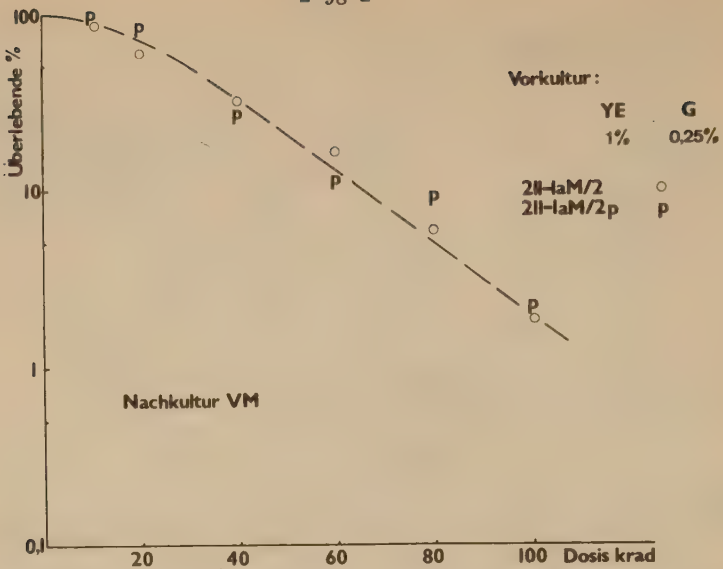


Abb. 8 Röntgendosis-effektkurve für den Stamm 211-1aM/2 nach einer Vorkultur in YG. Gleichzeitig sind die Röntgeninaktivierungspunkte einer aus dem Stamm 211-1aM/2 isolierten atmungsdefekten Mutante eingetragen (Stamm 211-1aM/2p₁).

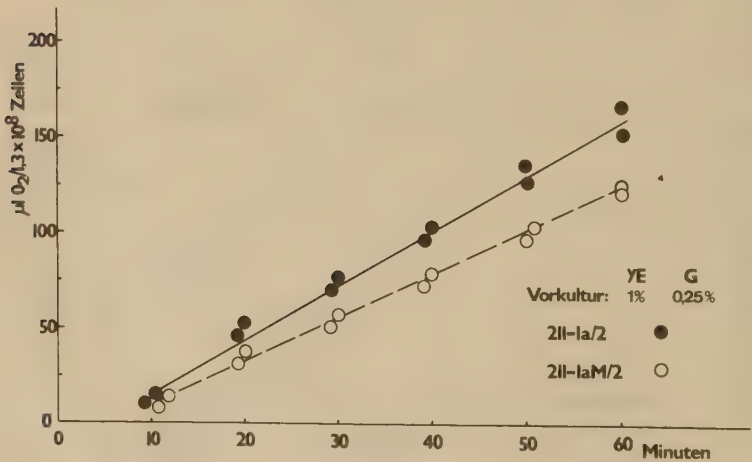


Abb. 9 Sauerstoffverbrauch bei den Stämmen 211-1a/2 und 211-1aM/2 in einer zweiprozentigen Glucoselösung über einen Zeitraum von 0 bis 60 Minuten nach Glucosezugabe im Puffer. Dreimal gewaschene Zellen aus der beginnenden stationären Wachstumsphase nach 24 Stunden Anzucht in YG. Messung im WARBURG-Apparat bei 30°C. Schüttelfrequenz 100 min⁻¹, Amplitude 2 cm.

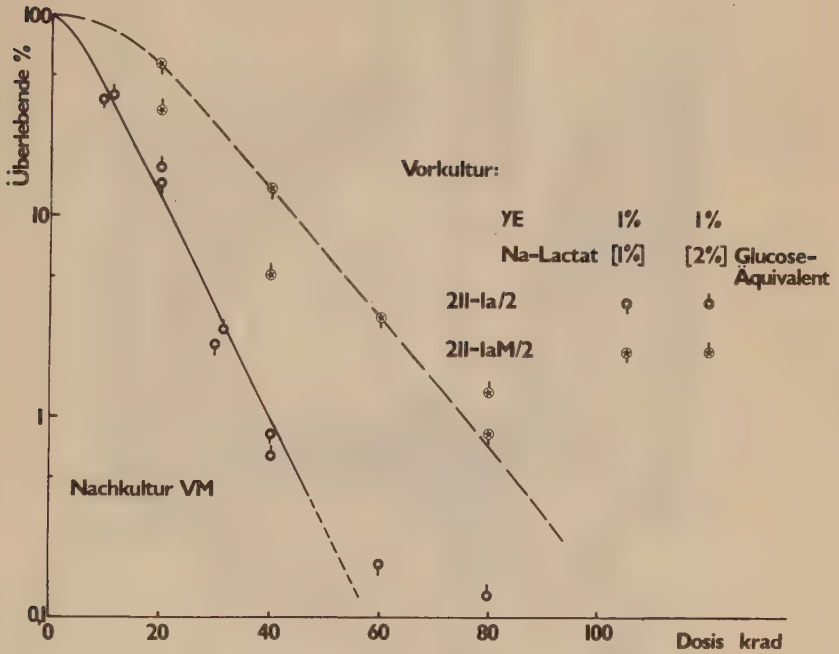


Abb. 10 Röntgendosiseffektcurven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach verschiedenen Lactatkonzentrationen im Vorkulturmedium.

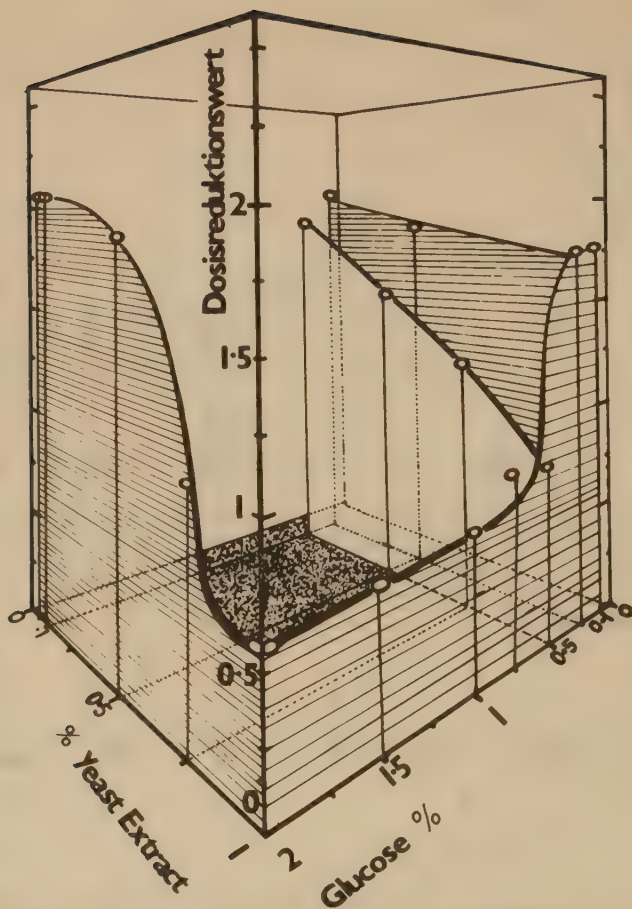


Abb. 11 Darstellung der Abhängigkeit des Dosisreduktionswerts, gebildet nach $DRW = \frac{LD_{10} \text{ 211-1aM/2}}{LD_{10} \text{ 211-1a/2}}$, von der Konzentration der Glucose und der Konzentration des Yeast-Extract im VorkulturmEDIUM.

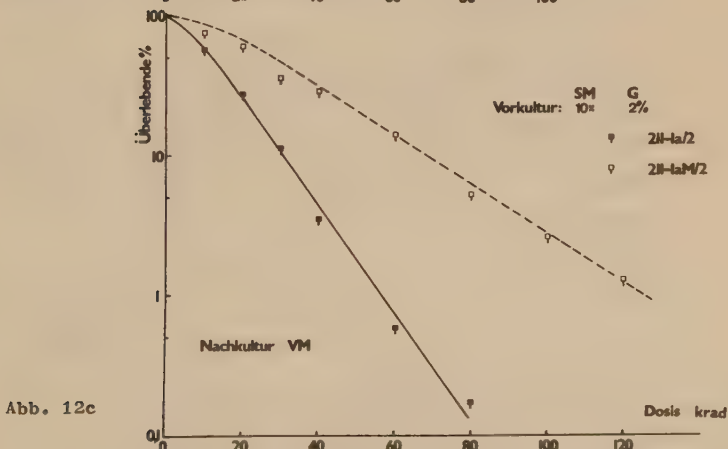
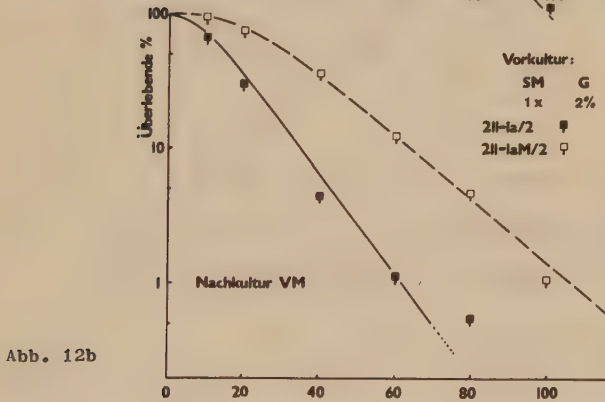
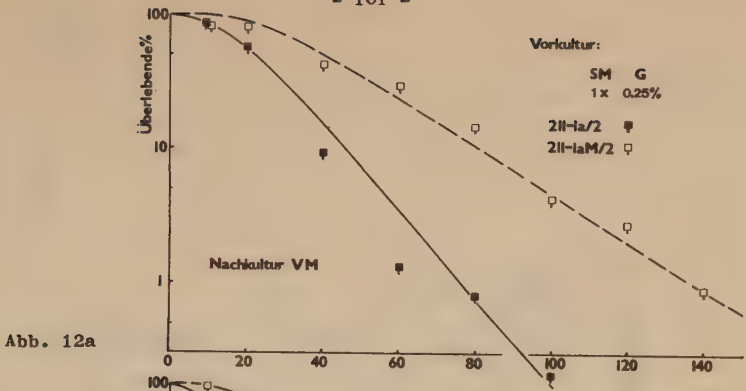


Abb. 12a, 12b, 12c. Röntgendosis-effekturven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach verschiedenen Konzentrationen der Mediumkomponenten eines synthetischen Mediums (SM) und der Glucose (G) im Vorkulturmedium.

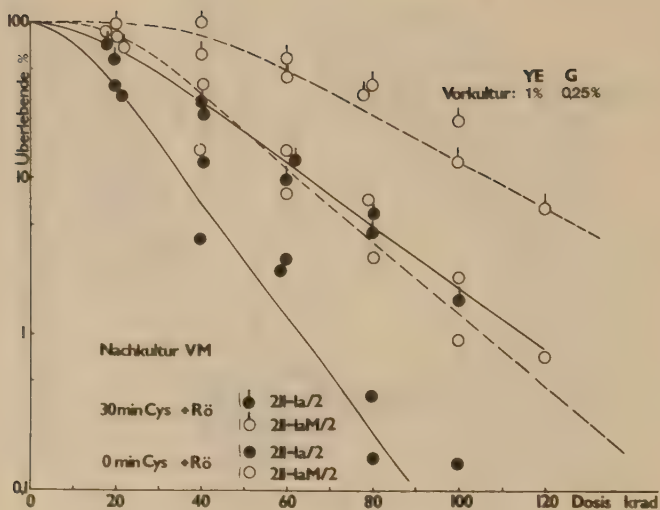


Abb. 13 Röntgendosis-effekt-kurven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach drei Tagen Vorkultur in YG und im Vergleich dazu nach drei Tagen in YG und 30 Minuten in 0,01 molarer L-Cysteinhydrochloridlösung. Bestrahlung in der Cysteinlösung.

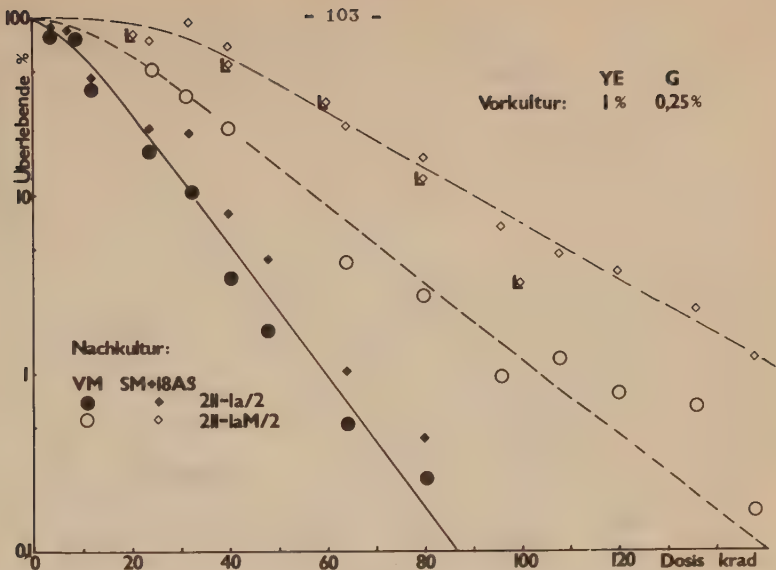


Abb. 14 Röntgendosiseffekturven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach drei Tagen Anzucht in YG. Vergleichendes Ausplatteten der bestrahlten Zellen auf VM-Agar, SM-Agar + 18 AS sowie bei dem Stamm 211-1aM/2 auf SM-Agar + 18 L-AS (Symbole mit einem L gekennzeichnet).

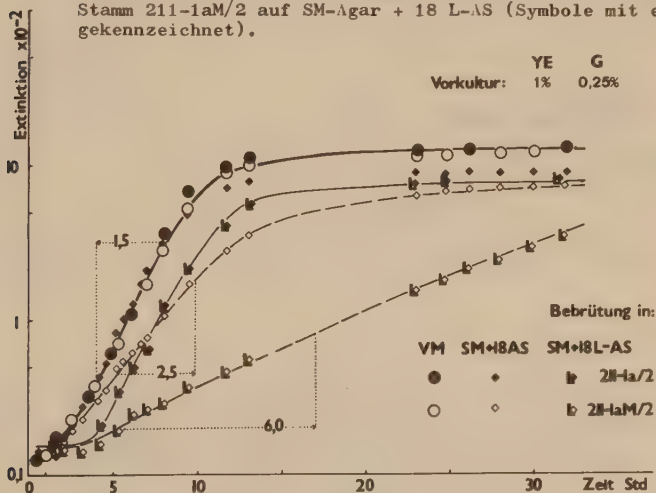


Abb. 15 Wachstumskurven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2. Wachstum von Zellen nach 24 Stunden Vorkultur in YG in verschiedenen Medien bei 30°C. Die an den Wachstumskurven angebrachten Ziffern bedeuten die Generationszeit (Dauer einer Zellverdopplungszeit) des entsprechenden Stammes in dem Medium. Wachstumsbestimmung durch Bestimmung der Änderung der Zellkonzentration im Medium mit Hilfe von Extinktionsmessungen. Extinktion ungefähr bis 0,6 proportional der Zellkonzentration.

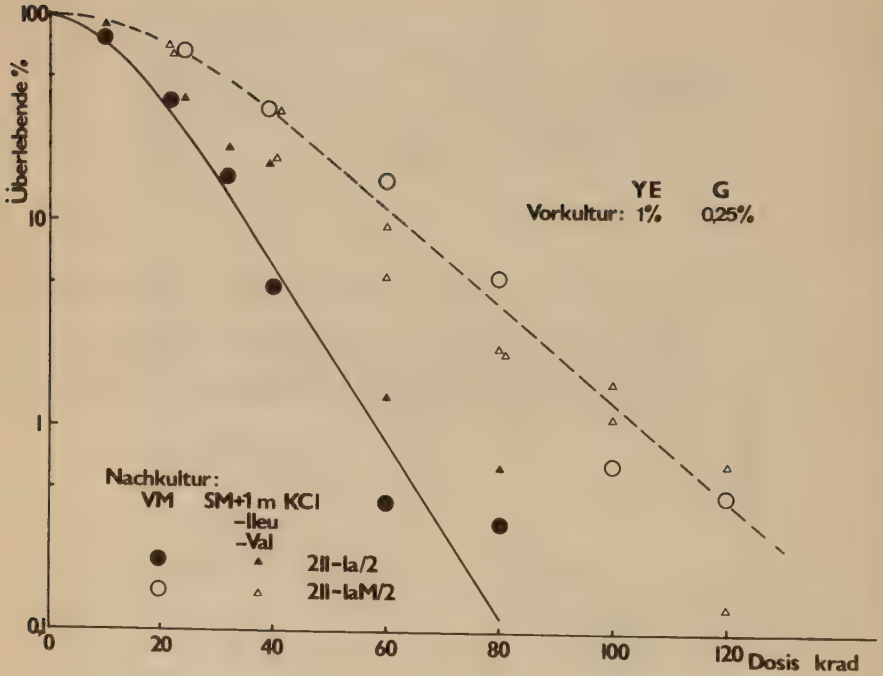


Abb. 16 Röntgendosis-effektkurven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach Anzucht in YG bei vergleichendem Ausplattieren der Zellen auf VM-Agar und SM-Agar + 1 m KCl - Ileu - Val.

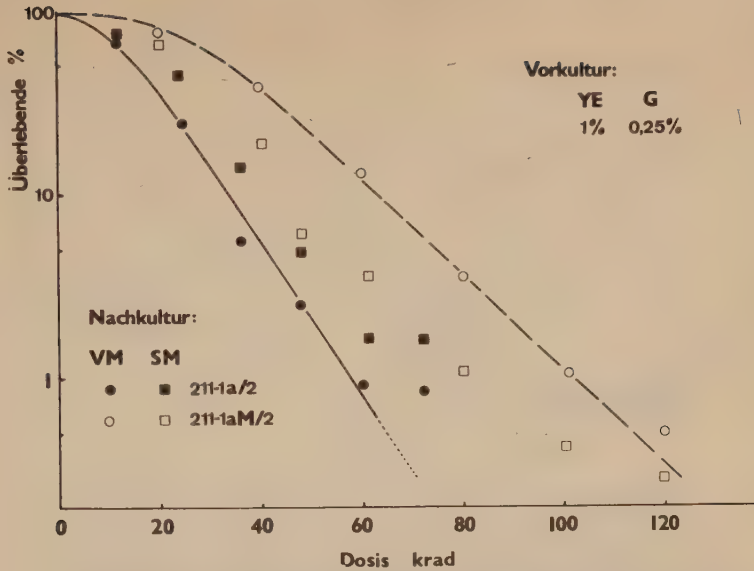


Abb. 17 Röntgendosis-effekt kurven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach Anzucht in YG auf Nachkulturmedium VM-Agar. Vergleichend hierzu sind die Inaktivierungspunkte für die beiden Stämme auf einem SM-Agar eingetragen.

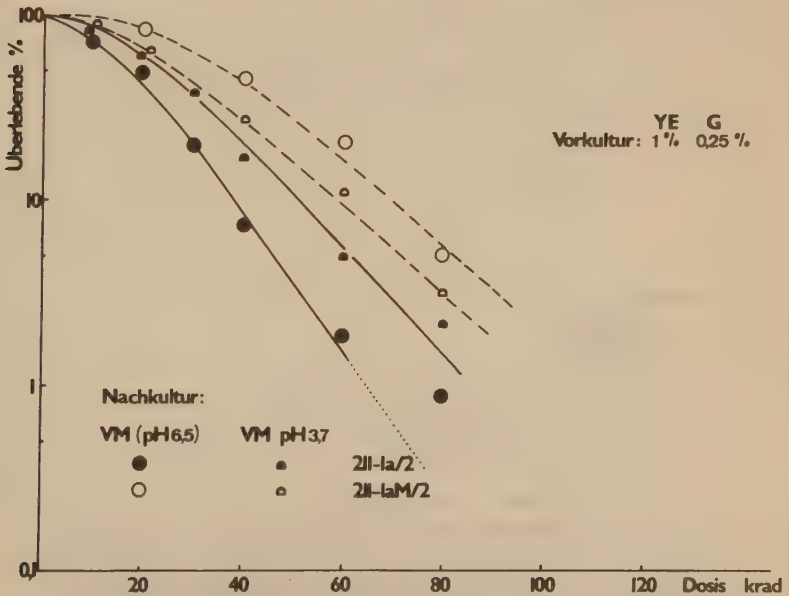


Abb. 18 Röntgendosis-effekt kurven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach Anzucht in YG und anschließendem Ausspateln auf VM-Agar sowie vergleichend hierzu auf einem VM-Agar, der mit HCl bis zum pH-Wert des SM angesäuert wurde.

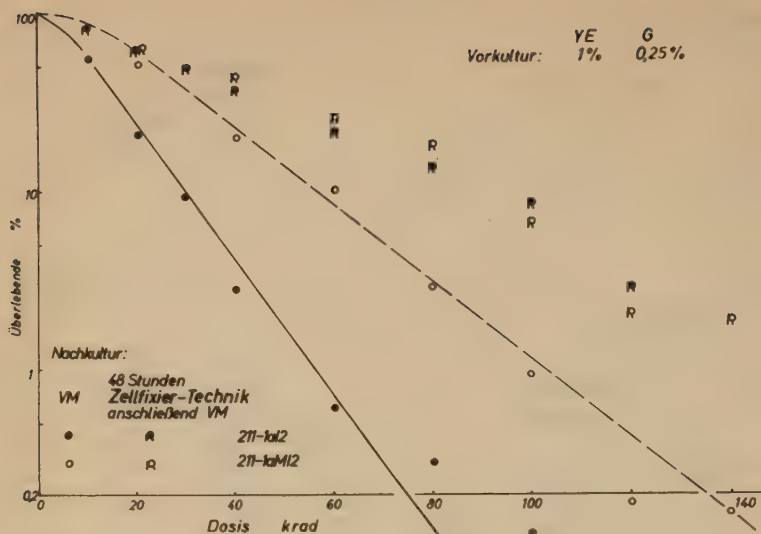


Abb. 19 Röntgendosiseffektkurven für die Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach Anzucht in YG bei sofortigem Ausplattieren der bestrahlten Zellen auf VM-Agar, sowie nach 48 Stunden Zellfixier-Technik und anschließendem Überschichten mit VM-Agar (von 39°C). Bebrütung der Zellen bei 30°C im Dunkeln.

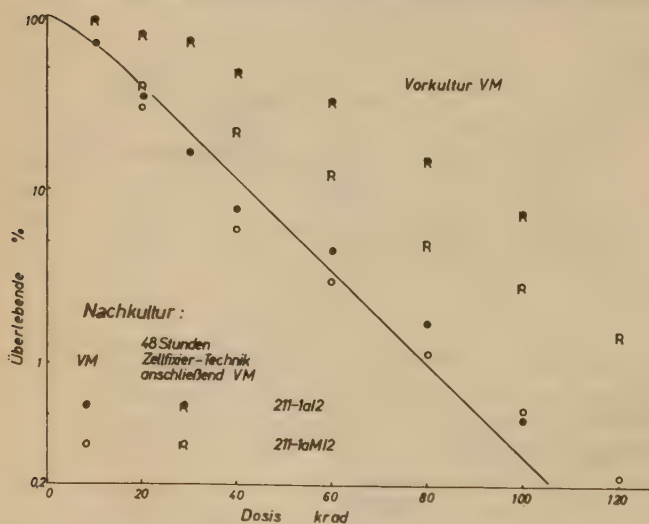


Abb. 20 Röntgendosiseffektkurven der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 nach Anzucht der Zellen in VM (Resistenzeffekt stellt sich nicht ein; DRW = 1) bei sofortigem Ausplattieren der bestrahlten Zellen auf VM-Agar, sowie nach 48 Stunden Zellfixier-Technik und anschließendem Überschichten mit VM-Agar (von 39°C). Bebrütung der Zellen bei 30°C im Dunkeln.

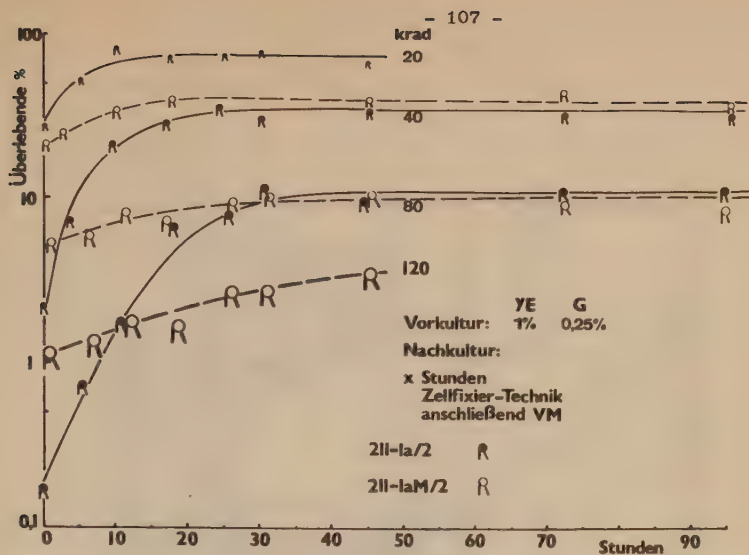


Abb. 21 Überlebende des Stammes 211-1a/2 und des Stammes 211-1aM/2 in Abhängigkeit von der Zeit der Zellfixierung auf 2 % Glucose-Agar. Überlebende bezogen auf unbestrahlte, jedoch sonst gleich behandelte Kontrollzellen. Anzucht der Zellen in YG (Resistenzeffekt stellt sich ein). Überschichten der Zellen mit VM-Agar (von 39°C) nach x Stunden Anwendung der Zellfixier-Technik. Bebrütung bei 30°C im Dunkeln. Typischer Versuch.

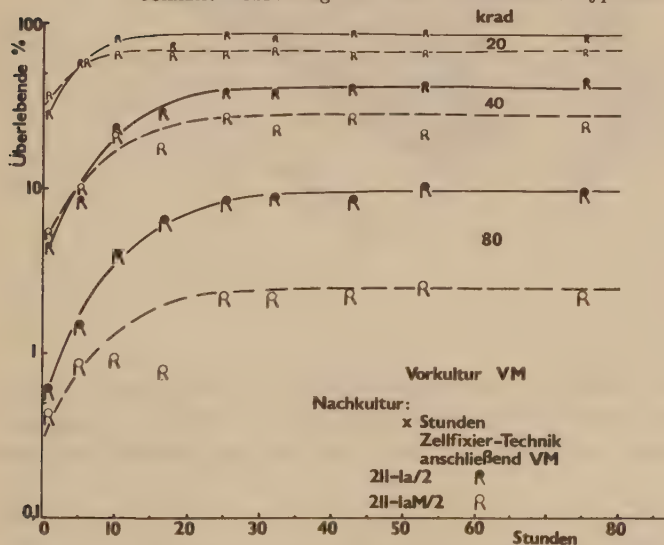


Abb. 22 Überlebende des Stammes 211-1a/2 und des Stammes 211-1aM/2 in Abhängigkeit von der Zeit der Zellfixierung auf 2 % Glucose-Agar. Überlebende bezogen auf unbestrahlte, jedoch sonst gleich behandelte Kontrollzellen. Anzucht der Zellen in VM (Resistenzeffekt stellt sich nicht ein, DRW = 1). Überschichten der Zellen mit VM-Agar (von 39°C) nach x Stunden Anwendung der Zellfixier-Technik. Bebrütung bei 30°C im Dunkeln. Typischer Versuch.

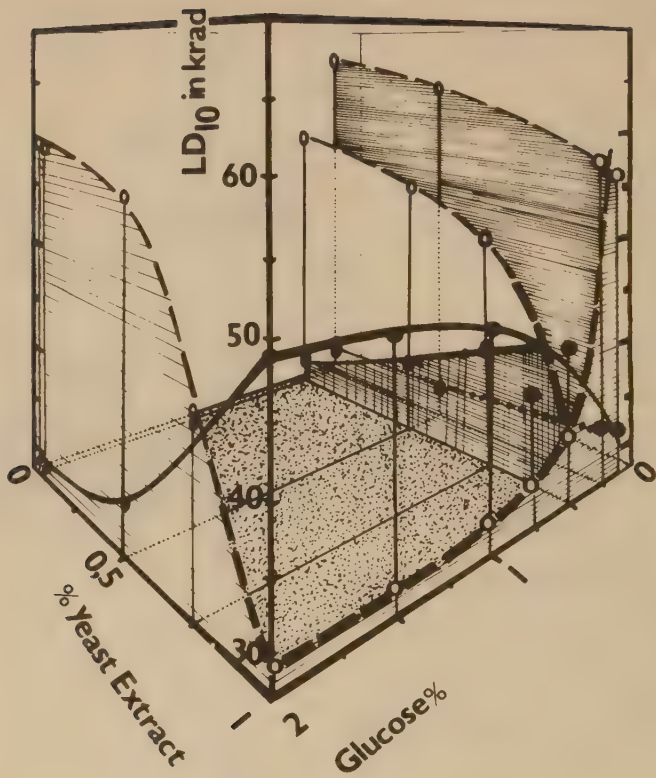


Abb. 23 LD₁₀ der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 in Abhängigkeit von der Konzentration an Glucose und Yeast-Extract (Difco) im Vorkulturmedium. Ausplatten der Zellen auf VM-Agar. 211-1aM/2 offene Symbole.

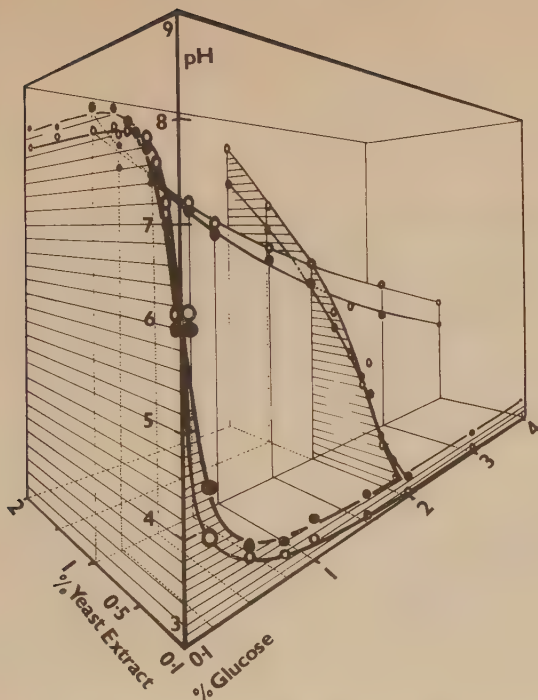


Abb. 24 pH-Werte von Hefeextrakt-Glucose Vorkulturmedien nach 24 Stunden Wachstum von Zellen der Stämme 211-1a/2 und 211-1aM/2 (offene Symbole) in Abhängigkeit von der Konzentration der Glucose und des Hefeextraktes des unverbrauchten Mediums (am Anfang des Wachstums der Kultur). Messung mit einem pH-Meter mit Kalomel-Elektrode.

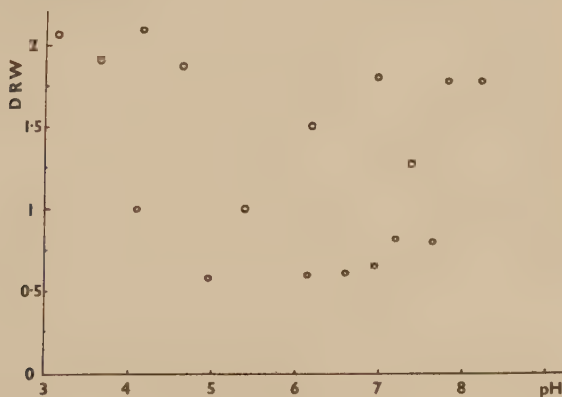


Abb. 25 Darstellung der Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit der pH-Werte aus Abb. 24 von den Dosisreduktionswerten (siehe Abb. 11) bei vergleichbarer Hefeextrakt- und Glucosekonzentration im Vorkulturmedium.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Laskowski bin ich für das Thema dieser Arbeit sowie die zahlreichen anregenden Diskussionen und die Förderung der Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Den Herren Prof. Dr. W. Stein und Dr. E.-R. Lochmann danke ich für viele Hinweise und Anregungen, die die Arbeit sehr gefördert haben.

Fräulein Heinke Kirschfeld und Frau Carola Meggers haben durch verantwortungsvolle Assistenz bei der Durchführung der Experimente sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen, wofür ich ihnen herzlich danken möchte. Mein besonderer Dank gilt Frau Carola Meggers für die Hilfe bei den zum Teil sehr umfangreichen Experimenten.

Dem Kurator der Freien Universität möchte ich an dieser Stelle danken für die Bereitstellung von Reisekostenzuschüssen für Fahrten zu wissenschaftlichen Kongressen, die den Fortgang der Arbeit gefördert haben.

LEBENS LAUF

Am 13. November 1933 wurde ich, Horst-Ulrich Schädel, als Sohn des damaligen Bankoberinspektors Walter Schädel und seiner Ehefrau Margot Schädel, geb. Gron, in Berlin geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Wandlitz (Mark) und Berlin von 1939 bis 1944. Von Herbst 1945 bis Herbst 1950 besuchte ich in Berlin die Schinkel-Oberschule, anschließend die Menzel-Oberschule. Dort legte ich 1954 die Reifeprüfung ab.

Im Jahre 1954 begann ich das Studium der Biologie, Chemie, Erziehungswissenschaften und Philosophie an der Freien Universität Berlin. Im Jahre 1961 legte ich vor dem Wissenschaftlichen Landesprüfungsamt Berlin das Examen in Erziehungswissenschaften und Philosophie ("Philosophicum") ab, im Jahre 1962 das Staatsexamen in Biologie und Chemie.

Nach dem Staatsexamen war ich als Oberschullehrer für Biologie und Chemie an einer Privatschule tätig und anschließend, von März 1963 bis September 1963, Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin. Von Oktober 1963 bis Mai 1965 war ich am selben Institut Wissenschaftlicher Hilfsassistent.

Seit Juni 1965 bin ich Wissenschaftlicher Assistent (m.d.W.b.) am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin.

Das Thema zu dieser Arbeit erhielt ich im Sommersemester 1963 von Herrn Prof. Dr. Laskowski.

